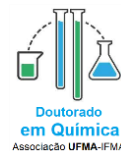




UNIVERSIDADE FEDERAL DO MARANHÃO
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E TECNOLÓGICAS
DOUTORADO ASSOCIADO UFMA – IFMA (DQUIM)
DOUTORADO EM QUÍMICA



MÔNICA ARAUJO DAS NEVES

**DESENVOLVIMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE BIOPRODUTOS ORIUNDOS DE
Fridericia platyphylla (CHAM.) L.G. LOHMANN ATUANDO EM LEISHMANIOSE**

São Luís
2025

MÔNCA ARAUJO DAS NEVES

**DESENVOLVIMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE BIOPRODUTOS ORIUNDOS DE
Fridericia platyphylla (CHAM.) L.G. LOHMANN ATUANDO EM LEISHMANIOSE**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação
Doutorado em Química (DQUIM) da Universidade
Federal do Maranhão como parte dos requisitos
exigidos para obtenção do título de Doutor em
Química.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Cláudia Quintino da Rocha.

São Luís
2025

Ficha gerada por meio do SIGAA/Biblioteca com dados fornecidos pelo(a) autor(a).
Diretoria Integrada de Bibliotecas/UFMA

Araujo das Neves, Mônica.

DESENVOLVIMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE BIOPRODUTOS
ORIUNDOS DE *Fridericia platyphylla* CHAM. L.G. LOHMANN ATUANDO EM
LEISHMANIOSE / Mônica Araujo das Neves. - 2025.
134 f.

Orientador(a): Cláudia Quintino da Rocha.

Tese (Doutorado) - Programa de Pós-graduação Doutorado em Química/ccet,
Universidade Federal do Maranhão, São Luís, 2025.

1. Doenças Negligenciadas. 2. Brachydinas. 3.
Nanofármacos. 4. Leishmaniose.

MÔNICA ARAUJO DAS NEVES

Desenvolvimento e Caracterização de Bioprodutos oriundos de *Fridericia platyphylla*
(CHAM.) L.G. LOHMANN atuando em Leishmaniose

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação
Doutorado em Química (DQUIM) da Universidade
Federal do Maranhão como parte dos requisitos
exigidos para obtenção do título de Doutor em
Química.

Apresentada em ____/____/____

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Cláudia Quintino da Rocha
DEQUI/UFMA

Prof. Dr. Gilvan Pereira de Figueredo
DAQ/IFMA

Profa. Dra. Kiany Sirley Brandão Cavalcante
DAQ/IFMA

Profa. Dra. Josy Anteveli Osajima Furtini
DEQUI/UFPI

Prof. Dr. Paulo Vitor Soeiro Pereira
DEPAT/UFMA

“O conhecimento adquirido através da experiência e do senso comum é limitado, mas a ciência baseia-se na verificação, na repetição e na revisão constante”.

Richard Feynman

RESUMO

As leishmanioses são doenças parasitárias negligenciadas causadas por protozoários do gênero *Leishmania*, representando um grave problema de saúde pública global. As terapias disponíveis são limitadas a poucos fármacos, como o antimoniato de meglumina, anfotericina B e miltefosina, todos associados a elevada toxicidade, altos custos e crescente resistência parasitária. Nesse contexto, a busca por novos compostos bioativos com maior seletividade e menor toxicidade torna-se essencial. Este trabalho apresenta a primeira evidência de que as braquidinas presentes na fração diclorometano (FDCM) de *Fridericia platyphylla* inibem a enzima triosefosfato isomerase (TIM) de *Leishmania*, afetando sua estabilidade e função catalítica. Essa descoberta abre novas perspectivas para o entendimento dos mecanismos moleculares da leishmaniose e para o desenvolvimento de novos fármacos. Experimentalmente, a FDCM apresentou atividade inibitória contra promastigotas de *L. infantum*, *L. braziliensis* e *L. mexicana*, com IC_{50} de 10,13, 11,44 e 11,16 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente, e contra amastigotas intracelulares de *L. infantum* ($IC_{50} = 4,81 \mu\text{g/mL}$). Além disso, demonstrou um perfil de citotoxicidade moderada para macrófagos RAW264.7 ($CC_{50} = 25,15 \mu\text{g/mL}$), com índice de seletividade ($SI = 5,2$), superior ao do antimoniato de meglumina ($SI = 2,7$), porém inferior ao da anfotericina B ($SI = 41,5$), sugerindo um potencial terapêutico viável. A fim de otimizar sua aplicação farmacêutica, a FDCM foi encapsulada em nanopartículas poliméricas de zeína (NPZ-FDCM) e poli(-caprolactona) (NPCL-FDCM). A NPZ-FDCM apresentou elevada eficiência de encapsulação (~99%), distribuição homogênea de tamanho e estabilidade por 49 dias, além de potencial zeta adequado para estabilidade coloidal. No ensaio antileishmanial, a NPZ-FDCM demonstrou maior eficácia contra formas amastigotas de *L. amazonensis* ($IC_{50} = 0,72 \mu\text{g/mL}$), enquanto a NPCL-FDCM não exibiu atividade significativa na concentração testada. Os achados deste estudo evidenciam a FDCM como uma alternativa promissora aos fármacos convencionais, combinando elevada seletividade, menor toxicidade e baixo impacto ambiental. A encapsulação em nanopartículas de zeína potencializa sua eficácia, reforçando seu potencial como candidato inovador para o tratamento da leishmaniose.

Palavras-chaves: Doenças negligenciadas, brachydinas, nanofármacos, Leishmaniose.

ABSTRACT

Leishmaniasis is a neglected parasitic disease caused by protozoa of the *Leishmania* genus, representing a serious global public health problem. Available therapies are limited to a few drugs, such as meglumine antimoniate, amphotericin B, and miltefosine, all associated with high toxicity, high costs, and increasing parasite resistance. In this context, the search for new bioactive compounds with greater selectivity and lower toxicity becomes essential. This study presents the first evidence that brachydins present in the dichloromethane fraction (FDCM) of *Fridericia platyphylla* inhibit the triosephosphate isomerase (TIM) enzyme of *Leishmania*, affecting its stability and catalytic function. This discovery opens new perspectives for understanding the molecular mechanisms of leishmaniasis and developing new drugs. Experimentally, FDCM exhibited inhibitory activity against promastigotes of *L. infantum*, *L. braziliensis*, and *L. mexicana*, with IC_{50} values of 10.13, 11.44, and 11.16 $\mu\text{g/mL}$, respectively, and against intracellular amastigotes of *L. infantum* ($IC_{50} = 4.81 \mu\text{g/mL}$). Furthermore, it demonstrated a moderate cytotoxicity profile for RAW264.7 macrophages ($CC_{50} = 25.15 \mu\text{g/mL}$), with a selectivity index ($SI = 5.2$), higher than that of meglumine antimoniate ($SI = 2.7$) but lower than that of amphotericin B ($SI = 41.5$), suggesting a viable therapeutic potential. To optimize its pharmaceutical application, FDCM was encapsulated in zein polymeric nanoparticles (NPZ-FDCM) and poly(ϵ -caprolactone) nanoparticles (NPCL-FDCM). NPZ-FDCM showed high encapsulation efficiency ($\sim 99\%$), homogeneous size distribution, and stability for 49 days, along with a suitable zeta potential for colloidal stability. In the anti-leishmanial assay, NPZ-FDCM demonstrated greater efficacy against amastigote forms of *L. amazonensis* ($IC_{50} = 0.72 \mu\text{g/mL}$), whereas NPCL-FDCM did not exhibit significant activity at the tested concentration. The findings of this study highlight FDCM as a promising alternative to conventional drugs, combining high selectivity, lower toxicity, and reduced environmental impact. Encapsulation in zein nanoparticles enhances its efficacy, reinforcing its potential as an innovative candidate for leishmaniasis treatment.

Keywords: Neglected diseases, brachydins, nanopharmaceuticals, Leishmaniasis.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.	<i>Fridericia platyphylla</i>	23
Figura 2.	Estrutura molecular da Brachydina A (1), Brachydina B (2) e Brachydina C (3) e seus respectivos pesos moleculares (PM). Fonte: da Rocha et al. (2014)	24
Figura 3.	Estrutura da Nanoemulsão (NE) (a) NE água em óleo (W/O), (b) NE óleo em água (O/W)	28
Figura 4.	Estrutura de lipossomas convencionais encapsulando drogas hidrofílicas e hidrofóbicas	30
Figura 5.	Estrutura das Nanopartículas Lipídicas	31
Figura 6.	Estrutura das Nanopartículas Poliméricas	35
Figura 7.	Estrutura das Nanopartículas Metálicas	37
Figura 8.	Estrutura química dos principais compostos, brachydina A (1), brachydina B (2) e brachydina C (3), por cromatograma HPLC-PDA e espectro UV dos compostos 1-3 da FDCM (fração diclorometano)	47
Figura 9.	Fragmentos observados na análise HPLC-ESI-MS/MS da FDCM de <i>Fridericia platyphylla</i> e fragmentação característica das brachyginas A, B e C. Os dados de espectrometria de massa foram comparados com da Rocha et al., 2014	48
Figura 10.	Frequências das classes de nucleóides e seus respectivos escores de danos detectados após 3 horas (A e B, respectivamente) e 24 horas (C e D, respectivamente) pelo ensaio Cometa realizado em macrófagos da cepa RAW 264.7 tratados com a FDCM a 40µg/mL, 25µg/mL e 10 µg/mL. CN: controle negativo (meio de cultura RPMI 1640). CP: controle positivo (H ₂ O ₂). CV: controle do veículo (macrófagos expostos a 0,5% de DMSO)	50
Figura 11.	Número de macrófagos (RAW 264.7) infectados com promastigotas de <i>L. infantum</i> durante 4 horas (A) e número de amastigotas internalizados após 24 horas (B) de tratamento com FDCM (DCM), Anfotericina B (AMB) e Antimoniato de Meglumina (AM)	51
Figura 12.	Número de formas amastigotas internalizadas em macrófagos (RAW 264.7) infectados com <i>L. infantum</i> e tratados com A) fração DCM, B) anfotericina B e C) antimoniato de meglumina em diferentes concentrações e horas	52
Figura 13.	Principais interações das brachyginas ancoradas na interface homodimérica do <i>l</i> iTIM. A) Brachydina 1 B) Brachydina 2 C) Brachydina 3	54
Figura 14.	Principais interações das brachyginas ancoradas no sítio catalítico do <i>l</i> iTIM. A) Brachydina 1 B) Brachydina 2 C) Brachydina 3	55
Figura 15.	Principais interações das brachyginas ancoradas na interface homodimérica do <i>l</i> bTIM. A) Brachydina 1 B) Brachydina 2 C) Brachydina 3	56
Figura 16.	Principais interações das brachyginas acopladas ao sítio catalítico do <i>l</i> bTIM. A) Brachydina 1 B) Brachydina 2 C) Brachydina 3	57
Figura 17.	Gráficos RMSD dos complexos de compostos de brachydina analisados com <i>l</i> iTIM calculados nos átomos pesados da espinha dorsal da proteína (Cα, N e O) durante 10ns de simulação DM	58

Figura 18.	Principais interações das brachydinas na interface homodimérica do <i>l</i> iTIM após 10ns de simulação DM. A) Brachydina 1 B) Brachydina 2 C) Brachydina 3	59
Figura 19.	Mapa de superfície da proteína, onde a região realçada indica a cavidade de ligação da brachydina na A) interface do dímero. B) sítio catalítico. Subsítio A da <i>l</i> iTIM em azul; Subsítio B da <i>l</i> iTIM em verde. Os hidrogénios foram ocultados para uma melhor visualização	59
Figura 20.	Principais interações das brachydinas no sítio catalítico do <i>l</i> iTIM após 10ns de simulação DM. A) Brachydina 1 B) Brachydina 2 C) Brachydina	60
Figura 21.	Perfil cromatográfico da fração diclorometânica (FDCM) do extrato hidroetanólico das raízes de <i>Fridericia platyphylla</i> ($\lambda = 240$ nm) .	69
Figura 22.	Curva analítica obtida para três brachydinas. Valores representam a média de dois experimentos realizados em triplicata (n=8)	70
Figura 23.	Perfil do pH das formulações de NPZ e NPCL contendo e não contendo a FDCM em função do tempo	74
Figura 24.	Eficiência de encapsulação (%) da FDCM nas nanopartículas NPZ e NPCL em função do tempo, determinação em triplicata (n=3)	76
Figura 25.	Espectro de infravermelho para: FDC (A), pluronic F-68 (B), zeína pura (C) e nanopartícula de zeína (NPZ-FDCM) contendo a FDCM (D)	77
Figura 26.	Espectro de infravermelho para: FDCM (A), PCL (B), e nanopartícula de PCL (NPCL-FDCM) contendo a FDCM (C)	78
Figura 27.	Termograma de Calorimetria Diferencial Exploratória para: FDCM (A), pluronic F-68 (B), zeína pura (C) e nanopartícula de zeína (NPZ-FDCM) contendo a FDCM (D)	81
Figura 28.	Termograma de Calorimetria Diferencial Exploratória para: FDCM (A), PCL (B), e nanopartícula de PCL (NPCL-FDCM) contendo a FDCM (C)	82
Figura 29.	Imagens de microscopia de força atômica das nanopartículas de: NPZ-FDCM 2D (A), NPZ-FDCM 3D (B), NPCL-FDCM 2D (C) e NPCL-FDCM 3D	84

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.	Estrutura e propriedades antiparsitárias de compostos isolados do gênero <i>Fridericia</i> (sin.: <i>Arrabidaea</i>)	21
Tabela 2.	Nanoemulsões carregadas com ativos vegetais como agentes leishmanicidas	29
Tabela 3.	Lipossomas carregadas com ativos vegetais como agentes leishmanicidas	30
Tabela 4.	Sistemas de liberação de matriz lipídica sólida (NLS e CLN) à base de plantas como agentes leishmanicidas	33
Tabela 5.	Nanopartículas poliméricas de base vegetal como agentes leishmanicidas	36
Tabela 6.	Nanopartículas metálicas de base vegetal como agentes leishmanicidas	38
Tabela 7.	Concentração inibitória detectada em <i>Leishmania spp</i> e macrófagos tratados com a fração diclorometano, anfotericina B, antimoniato de meglumina e tártaro emético	48
Tabela 8.	Valores médios de RMSD para complexos de compostos de brachydina com <i>l</i> /TIM em simulações DM de 10 ns (Å).....	58
Tabela 9.	Energias livres de ligação dos compostos de brachydina	61
Tabela 10.	Energias livres de ligação dos compostos de brachydinas em complexo com <i>l</i> bTIM	61
Tabela 11.	Condições cromatográficas ajustadas para a quantificação das brachydinas da FDCM nas nanopartículas	63
Tabela 12.	Padrões utilizados no desenvolvimento do estudo	70
Tabela 13.	Resultado do diâmetro hidrodinâmico (Dh) para as nanopartículas	71
Tabela 14.	Resultado do índice de polidispersão (Pdl) para as nanopartículas	72
Tabela 15.	Resultado do potencial zeta (ζ) para as nanopartículas	73
Tabela 16.	Concentração inibitória detectada nas formas promastigotas e amastigotas de <i>L. amazonensis</i> e macrófagos RAW 264.7 tratados com a NPZ-RAB, NPCL-RAB	85

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

LV – Leishmaniose Visceral
LC – Leishmaniose Cutânea
LMC – Leishmaniose Mucocutânea
OPAS – Organização Pan-Americana da Saúde
OMS – Organização Mundial da Saúde
DNA – Ácido dextrorribonucleico
FDA – Federal Drug Administration
EUA – Estados Unidos da América
FDCM – Fração Diclorometano
NC – nanocarreadores
NP - nanopartícula
NEs – Nanoemulsões
LPs – lipossomas
NLS - nanopartículas lipídicas sólidas
CLN - carreadores lipídicos nanoestruturados
nm – nanômetro
PCL – poli (ϵ -caprolactona
AM - antimoniato de meglumina
TAR - ártaro emético
AMB - anfotericina B
PTD - pentamidina
M Φ - Macrófagos murinos RAW 264.7
SFB – Soro Fetal Bovino
pH – Potencial de hidrogênio
 $\mu\text{g/mL}$ – micrograma por mililitro
 mg/mL – miligrama por mililitro
 μL – microlitro
 IC_{50} – Concentração Inibitória
MTT - (3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-di- fenil brometo de tetrazolina)
DMSO – Dimetil sulfóxido
 H_2O_2 - peróxido de hidrogênio
 CO_2 – Dióxido de carbono
HCl – Ácido Clorídrico
 CC_{50} – Concentração Citotóxica
PBS – Tampão fosfato-salino

ANOVA – Análise de Variância

DO – Densidade Óptica

SI – Índice de Seletividade

TIM – enzima triose-fosfato isomerase

*li*TIM - *L. infantum* TIM

*lb*TIM – *L. braziliensis* TIM

DM – docagem molecular

DHAP - fosfato de dihidroxiacetona

G3P - gliceraldeído-3-fosfato

MM-PBSA - mecânica molecular [MM] com Poisson-Boltzmann [PB] e solvatação de área de superfície

MM-GBSA - mecânica molecular [MM] generalizada de Born [GB] e área de superfície

RMSD - desvio médio quadrático

Arg - arginina

Asp - aspartato

Asn - asparagina

Glu - glutamina

Thr - treonina

Phe - fenilalanina

Ala - alanina

Tyr - tirosina

Lys -lisina

Ile -isoleucina

Gly -glicina

NPCL - nanopartículas de PCL

NPCL-FDCM - nanopartículas de PCL contendo a fração diclorometano

NPZ - nanopartículas de zeína

NPZ-FDCM - nanopartículas de zeína contendo a fração diclorometano

CDE - Calorimetria Diferencial Exploratória

MFA - Microscopia de força atômica

FTIR - Espectroscopia no Infravermelho por Transformada de Fourier

Dh - diâmetro hidrodinâmico

PdI - índice de polidispersão

ζ - potencial zeta

BRA 1 - brachydina A (1),

BRA 2 - brachydina B (2)

BRA 3 - brachydina C (3)

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	14
2	OBJETIVOS	16
2.1	Objetivo Geral	16
2.2	Objetivos Específicos	16
3	REFERENCIAL TEÓRICO	17
3.1	Leishmanioses	17
3.2	Tratamento convencional das leishmanioses e suas limitações	18
3.3	Uso de plantas como opção de novas terapias	19
3.4	Gênero <i>Fridericia</i> com potencial medicinal	20
3.4.1	<i>Fridericia platyphylla</i> (CHAM.) L.G. Lohmann	23
3.5	Emprego de nanofármacos à base de plantas para o tratamento da Leishmaniose	24
3.6	Nanocarreadores à base de plantas e seus usos no tratamento da Leishmaniose.....	27
3.6.1	Nanoemulsões	28
3.6.2	Lipossomas	29
3.6.3	Nanopartículas Lipídicas	31
3.6.4	Nanopartículas Poliméricas	34
3.6.5	Nanopartículas Metálicas	36
4	MATERIAIS E MÉTODOS (Parte 1)	39
4.1.	Padrões, Solventes e Reagentes	39
4.2.	Material Vegetal	39
4.3.	Obtenção e Fracionamento do Extrato	40
4.4.	Cultura Celular	40
4.5.	Parasitas	40
4.6.	Atividade anti promastigota	41
4.7	Atividade anti amastigota	42
4.8	Ensaio de Viabilidade Celular	42
4.9	Índice de Seletividade	42
4.10	Análise de genotoxicidade através do ensaio cometa	43
4.11	Teste de invasão	44
4.12	Teste de multiplicação	44
4.13	Análise estatística	45
4.14	Previsão de estrutura	45
4.14.1	Docagem molecular (DM)	45
4.14.2	Simulação de docagem molecular (DM)	46
4.14.3	Cálculo de energia livre de ligação	47
5	RESULTADOS E DISCUSSÕES (Parte 1)	47
5.1	Caracterização química da FDCM	47
5.2	FDCM apresenta atividade antileishmanial	48
5.3	FDCM não induz dano <i>in vitro</i> no DNA	49
5.4	FDCM reduz a capacidade da <i>L. infantum</i> de invadir macrófagos	50
5.5	FDCM inibe a multiplicação de <i>L. infantum</i> em macrófagos	51
5.6	Resultados de Docagem Molecular (DM)	52
5.6.1	Resultados de simulação de DM	57
6.	MATERIAIS E MÉTODOS (Parte 2)	62
6.1	Padrões, Solventes e Reagentes	62

6.2	Desenvolvimento da nanoformulação	62
6.2.1	<i>Preparo das nanopartículas de poli (ϵ-caprolactona) – PCL</i>	62
6.2.2	<i>Preparo das nanopartículas de zeína</i>	63
6.3	Desenvolvimento de metodologia analítica de quantificação de brachyquinas	63
6.3.1	<i>Otimização das condições cromatográficas</i>	63
6.3.2	<i>Linearidade</i>	64
6.4	Caracterização Físico-Química das nanopartículas	64
6.4.1	<i>Estabilidade Físico-Química</i>	64
6.4.1.1	Diâmetro hidrodinâmico, índice de polidispersão e potencial zeta	64
6.4.1.2	Análise do pH	65
6.4.1.3	Eficiência de encapsulação	65
6.4.2	<i>Espectroscopia no Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR)</i>	65
6.4.3	<i>Calorimetria Diferencial Exploratória (CDE)</i>	65
6.4.4	<i>Microscopia de força atômica (MFA)</i>	66
6.5	Ensaio biológicos das nanopartículas	66
6.5.1	<i>Manutenção das formas promastigotas de L. amazonensis</i>	66
6.5.2	<i>Diferenciação das formas promastigotas em amastigotas axênicas de L. amazonensis</i>	66
6.5.3	<i>Atividade Antileishmania in vitro</i>	67
6.5.4	<i>Manutenção de macrófagos RAW 264.7</i>	67
6.5.5	<i>Ensaio de citotoxicidade em macrófagos RAW 264.7 in vitro</i>	68
6.5.6	<i>Ensaio de MTT</i>	68
7	RESULTADOS E DISCUSSÕES (Parte 2)	68
7.1	Desenvolvimento da metodologia analítica para quantificação das brachyquinas nas nanopartículas	68
7.1.1	<i>Otimização das condições cromatográficas</i>	68
7.1.2	<i>Linearidade</i>	69
7.2	Caracterização Físico-Química das nanopartículas	70
7.2.1	Diâmetro hidrodinâmico, índice de polidispersão e potencial zeta	70
7.2.2	Análise do pH	73
7.2.3	Eficiência de encapsulação	75
7.2.4	<i>Espectroscopia no Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR)</i>	76
7.2.5	<i>Calorimetria Diferencial Exploratória (CDE)</i>	80
7.2.6	<i>Microscopia de força atômica (MFA)</i>	84
7.3	Nanopartículas contendo FDCM de <i>F. platyphylla</i> apresenta atividade antileishmania <i>in vitro</i>	85
8	CONCLUSÃO	87
	REFERÊNCIAS	88
	APÊNDICE I	106

1. Introdução

No século XXI, vive-se um paradoxo da inovação na área de saúde. O conhecimento da ciência e da tecnologia é enorme e cada vez mais veloz, oferecendo infinitas possibilidades tecnológicas de tratar todas as formas de doenças. Entretanto, nem sempre essas possibilidades e avanços terapêuticos têm sido aproveitados para melhorar o acesso das populações aos medicamentos, em especial as acometidas por doenças negligenciadas, principalmente devido as poucas opções de fármacos tanto em países desenvolvidos como em desenvolvimento (Hasenclever et al., 2017).

A leishmaniose é uma doença infecto parasitária altamente negligenciada causada por várias espécies de *Leishmania*. É uma doença endêmica em 98 países e territórios e continua sendo um grande problema de saúde nas 4 regiões ecoepidemiológicas do mundo (nas Américas, no leste da África, no norte da África e no oeste/sudeste da Ásia) com 600.000 a 1 milhão de novos casos de leishmaniose cutânea e 50.000 a 90.000 de leishmaniose visceral ocorrendo anualmente, representando, assim, um importante problema de saúde pública global (OMS, 2022). A leishmaniose cutânea humana é causada por pelo menos doze espécies, sete das quais ocorrem no Brasil: *Leishmania (V.) braziliensis*, *L. (V.) guyanensis*, *L. (L.) amazonensis*, *L. (V.) lainsoni*, *L. (V.) naiffi*, *L. (V.) lindenberg* e *L. (V.) shawi*, com o maior número de relatos registrados para *L. braziliensis*. A *Leishmania infantum*, por outro lado, causa a leishmaniose visceral, a forma mais grave da doença, e já foi registrada em pelo menos 12 países da América Latina, com 90% de todos os casos ocorrendo no Brasil (Brasil, 2017).

Os tratamentos atuais da leishmaniose são limitados principalmente a antimoniais pentavalentes (antimônio meglumina e estibogluconato de sódio) e não antimoniais (pentamidina, anfotericina B, paromomicina e miltefosina) (Comandolli-Wyrepkowski et al., 2020). No entanto, apesar de serem eficazes contra várias espécies de *Leishmania*, esses medicamentos causam efeitos adversos graves, incluindo recidivas, genotoxicidade, resistência do parasita e alta toxicidade (Lima et al., 2010; Rijal et al., 2013; Castelo-Branco et al., 2016; Castelo-Branco et al., 2019; Romero et al., 2017; Silva et al., 2021).

Nesse sentido, devido às limitações das opções terapêuticas atuais, a descoberta de novos medicamentos e alvos bioquímicos torna-se essencial. Os produtos naturais têm sido empregados ao longo do tempo como fontes potenciais de

compostos bioativos para o tratamento de várias doenças, incluindo doenças tropicais negligenciadas, especialmente aquelas causadas por protozoários (Singh & Sundar, 2014). Pesquisas sobre compostos ativos presentes em extratos de plantas que apresentam atividade leishmanicida demonstraram que os compostos mais promissores parecem ser flavonoides, triterpenoides, esteroides e taninos (Lima et al., 2015).

Fridericia platyphylla (Sin.: *Arrabidaea brachypoda*) é uma planta típica do cerrado brasileiro, conhecida popularmente como "cervejinha do campo" ou "cipó-uma". Fitoquimicamente, essa espécie é conhecida como fonte de flavonoides, triterpenos, saponinas, taninos e polifenóis (da Rocha et al., 2011). Na medicina tradicional, tem sido empregada para o tratamento de cálculos renais dores nas articulações (artrite) (da Rocha et al., 2015), enquanto vários estudos também demonstraram efeitos antifúngicos (Alcerito et al., 2002), antivirais (Brandão et al., 2010), antimicrobianas (de Sousa Andrade et al., 2020), anti-inflamatórias e antinoceptivas (da Rocha et al., 2011), bem como atividades *in vitro* e *in vivo* anti *Trypanosoma cruzi* (da Rocha et al., 2014). Mais recentemente, foi detectada atividade leishmanicida para cada um dos três flavonoides diméricos (brachydinas A, B e C) presentes na fração diclorometano (DCM) das raízes de *Fridericia platyphylla* (Rocha et al., 2019). Por outro lado, também foi demonstrada atividade antitumoral na FDCM total (Maciel-Silva et al., 2022; de Lima et al., 2022; Nunes et al., 2020).

Considerando a riqueza da biodiversidade brasileira e a necessidade de se promover o uso sustentável dessa diversidade, propomos a utilização da fração apolar (FDCM) da espécie medicinal *Fridericia platyphylla* para a produção de bioprodutos, nanoestruturados com ação em doenças negligenciadas, com especial atenção à Leishmaniose. Nosso objetivo foi validar a ação antileishmanial da fração apolar enriquecida com as três brachydinas sem a necessidade de isolar esses compostos, permitindo a fabricação de medicamentos antileishmaniais a custos mais baixos. Além disso, realizar estudos experimentais e computacionais combinados com o intuito de obter informações sobre a atividade de inibição das brachydinas sobre a *Leishmania* e por fim incorporar a fração em formulações nanoestruturadas e avaliar a eficácia das mesmas.

2. Objetivos

2.1. Objetivo Geral

Desenvolver nanoformulações contendo compostos bioativos da *Fridericia platyphylla* visando o combate a doenças negligenciáveis, em especial a leishmaniose.

2.2. Objetivos Específicos

- a) Avaliar a atividade antileishmania *in vitro* da fração apolar rica em brachydinas (FDCM) obtida de raízes de *F. platyphylla* ;
- b) Realizar estudos de docagem molecular entre brachydinas presentes na fração diclorometano (FDCM) e a enzima triosefosfato isomerase em *Leishmania infantum* (liTIM) e *Leishmania braziliensis* (lbTIM);
- c) Desenvolver e caracterizar nanoformulações contendo a fração diclorometano (FDCM) da *F. platyphylla* ;
- d) Avaliar a atividade antileishmania e a toxicidade dos nanocompostos desenvolvidos.

3. Referencial teórico

3.1 Leishmanioses

A leishmaniose é uma antroponose, altamente negligenciada, causada por protozoários parasitas do gênero *Leishmania*. Compõe um complexo de doenças parasitárias com amplo espectro clínico e diversidade epidemiológica, que possui ampla distribuição geográfica e morbimortalidade, estando entre as seis endemias consideradas prioritárias no mundo (OPAS, 2019).

A doença cursa com diferentes manifestações clínicas, classificadas de três formas: 1) forma visceral (*Leishmania visceral* – LV), popularmente conhecida como calazar, geralmente fatal se não tratada; 2) forma cutânea (*Leishmania cutânea* – LC), caracterizada pela formação de úlceras na pele; e 3) forma mucocutânea (*Leishmania mucocutânea* – LMC), que invade as membranas mucosas do trato respiratório superior, destruindo tecidos moles no nariz, boca e garganta, causando severas mutilações no paciente (WHO, 2022).

Estimativa realizada pela Organização Mundial de Saúde (OMS) revela que anualmente ocorrem de 700 mil a 1 milhão de novos casos e 20 mil a 30 mil mortes ocasionados tanto pela leishmaniose visceral quanto pela cutânea, representando assim um problema de saúde pública mundial (WHO, 2022). O Brasil é considerado um país endêmico com prevalência de casos nas regiões Norte e Nordeste, acometendo majoritariamente indivíduos que residem em zonas rurais e de baixa renda (BRASIL, 2017).

A transmissão da doença em seres humanos ocorre por meio da picada de flebotomíneos fêmeas infectadas, especialmente dos gêneros *Phlebotomus* e *Lutzomyia*. No Brasil, o vetor preponderante é o *Lutzomyia longipalpis* (CAMPOLINA et al., 2020). Durante o processo de transmissão, a forma infecciosa (promastigota) é fagocitada por macrófagos e, uma vez no interior dessas células, ela se converte na forma intracelular obrigatória (amastigota). As amastigotas conseguem se adaptar e sobreviver no fagolisossomo. Nesse ambiente, elas se multiplicam e, ao serem liberadas, têm a capacidade de infectar novas células (VON STEBUT, 2015).

Segundo dados do Sistema de Informação de Agravos de Notificação (Sinan Net), o Maranhão caracteriza-se como o estado brasileiro com maior prevalência e incidência de casos confirmados de leishmaniose no Brasil. Desde 2013 o estado ocupa a primeira posição quanto ao número de casos de leishmaniose visceral e cutânea, com cerca de 400 e 1.100 novos casos por ano, respectivamente (Brasil,

2016). São Luís é a cidade do Maranhão com maior registro de doenças, totalizando aproximadamente 31,5% dos casos ocorridos entre 2012 e 2021, recebendo destaque os casos de leishmaniose visceral, que representa um problema de saúde pública regional desde a década de 80 (Sousa, 2022).

3.2 Tratamento convencional das leishmanioses e suas limitações

Por ser um grave problema de saúde pública mundial, o diagnóstico preciso e tratamento adequado dos casos de leishmaniose são essenciais para obtenção de dados confiáveis que sustentem o desenvolvimento de estratégias públicas de controle da doença e para a manutenção de níveis baixos de prevalência (OPAS, 2022).

Os antimoniais pentavalentes (Sb^{5+}) representam o tratamento de primeira escolha contra a leishmaniose, dispondo de duas formulações comerciais: o Glucantime® (antimoniato de N-metil D-glucamina), utilizado há mais de sete décadas no Brasil e no mundo, e o Pentostam® (estibogluconato de sódio), não comercializado no Brasil. A ação dos antimoniais bloqueia enzimas do parasita cruciais na oxidação de ácidos graxos e glicólicos, levando à esgotamento do ATP intracelular. A conversão do antimônio pentavalente para a forma trivalente (Sb^{3+}), altamente tóxica aos parasitas, interrompe o metabolismo dos tióis (ANVERSA et al, 2018; ROATT et al., 2020; SASIDHARAN; SAUDAGAR, 2021).

Apesar dos antimoniais serem a escolha basilar para tratar leishmanioses, seu uso acarreta diversos efeitos adversos, notadamente ao término do tratamento. O efeito colateral preponderante associa-se a problemas cardiovasculares, e outros sintomas são observados, como náuseas, vômitos, diarreia, artralgias, mialgias, anorexia, elevação de enzimas hepáticas, convulsões, pancreatite química e nefrotoxicidade (ORDÓNEZ-GUTIÉRREZ et al., 2007, RIBEIRO et al., 2014).

Quando o tratamento antimonial não gera melhora ou é contraindicado, o tratamento de segunda escolha no Brasil é a anfotericina B (BRASIL, 2014; ROATT et al., 2020; SASIDHARAN; SAUDAGAR, 2021). A anfotericina B é um poderoso agente leishmanicida, eficaz contra promastigotas e amastigotas do parasita, evidenciando bons resultados in vitro e in vivo. Sendo um antifúngico isolado do fungo *Streptomyces nodosus*, exibe ação fungicida primordial, também atuando contra protozoários do gênero *Leishmania spp.* Seu mecanismo preponderante consiste na afinidade com ésteres (ergosterol ou episterol) presentes na membrana plasmática de

Leishmania, o que culmina em formação de poros na membrana e lise osmótica, resultando na morte do parasita (ROATT et al., 2020; SASIDHARAN; SAUDAGAR, 2021). O Ministério da Saúde oferta duas apresentações de anfotericina B: desoxicolato de anfotericina B e anfotericina B lipossomal (AmBisome®), sendo que esta última apresenta menor toxicidade, embora as duas tenham eficácia comparável (BRASIL, 2011).

Embora eficaz, o uso da anfotericina B é limitado. Além do custo elevado, os pacientes requerem monitoramento contínuo dos efeitos colaterais, mesmo após o término do tratamento. As reações adversas mais comuns compreendem febre, cefaleia, náuseas, vômitos, tremores, calafrios e dor lombar. O desoxicolato de anfotericina B pode causar também anorexia, tremores, calafrios, flebite, cianose, hipotensão, hipopotassemia, hipomagnesemia, disfunção renal e perturbações comportamentais (BRASIL, 2014, ROATT et al., 2020; SASIDHARAN; SAUDAGAR, 2021).

Outra substância usada contra leishmaniose é a miltefosina (hexadecilfosfocolina), originalmente desenvolvida como agente antineoplásico e pioneira na administração oral contra LV. Seu mecanismo de ação está relacionado a sua capacidade de gerar distúrbios tanto no metabolismo quanto na composição da membrana do parasito, com indução de morte celular semelhante a apoptose. A miltefosina acarreta efeitos adversos significativos, incluindo nefrotoxicidade, teratogenicidade e distúrbios gastrointestinais devido à administração oral. Sua meia-vida prolongada favorece a seleção de parasitas resistentes (DORLO et al., 2012; SASIDHARAN; SAUDAGAR, 2021).

3.3 Uso de plantas como opção de novas terapias

As terapias atualmente disponíveis para o tratamento das leishmanioses enfrentam notáveis limitações, sendo a alta toxicidade um problema proeminente (SANTIAGO, 2021). Diante das dificuldades terapêuticas, a Organização Mundial da Saúde (OMS), por meio do Programa de Doenças Tropicais, fomenta a exploração de alternativas terapêuticas mais eficazes e com menor toxicidade para os pacientes, como o reposicionamento de fármacos, combinações de medicamentos, renovação farmacológica e uso de produtos naturais (WHO, 2022). No entanto, apesar da busca constante por princípios ativos de fontes naturais para doenças negligenciadas, são escassas as descobertas oriundas de plantas (FERREIRA & ANDRICOPULO, 2019).

O interesse em plantas medicinais e produtos naturais para combater doenças parasitárias tem crescido consideravelmente nos últimos anos (SANTOS-LIMA et al., 2016). As plantas oferecem vastas oportunidades para encontrar medicamentos, especialmente para terapias antiparasitárias. A eficácia e os mecanismos de ação dos medicamentos derivados de produtos naturais têm sido alvo de investigação mais profunda nas últimas três décadas. Alguns pesquisadores têm explorado alternativas inovadoras no tratamento das leishmanioses, baseando-se na etnofarmacologia, que emprega o conhecimento tradicional de plantas medicinais para descobrir medicamentos de menor toxicidade e custo (BEZERRA et al., 2006; DIAS CABOCLO et al., 2022).

O Brasil se destaca por possuir uma vasta diversidade vegetal, com mais de 55.000 espécies catalogadas. Contudo, mesmo com tal diversidade, apenas 8% desse potencial biológico foi investigado para identificar compostos bioativos, e somente 1.100 espécies vegetais tiveram suas propriedades medicinais avaliadas (SIMÕES et al., 2004; BRASIL, 2006). No país, a Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares (PNPIC) no âmbito do Sistema Único de Saúde (SUS) foi instituída para ampliar as opções terapêuticas aos usuários, garantindo acesso seguro, eficaz e de qualidade a plantas medicinais, fitoterápicos e serviços relacionados à fitoterapia, com ênfase na integralidade da atenção à saúde (BRASIL, 2006). As plantas englobam uma variedade de metabólitos secundários, como alcaloides, chalconas, flavonoides, lignanas, naftoquinonas e terpenos, muitos dos quais são relatados na literatura por sua atividade leishmanicida (ROCHA et al., 2005; SANTOS-LIMA et al., 2016).

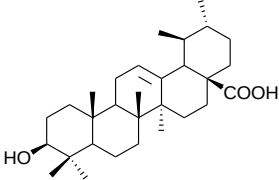
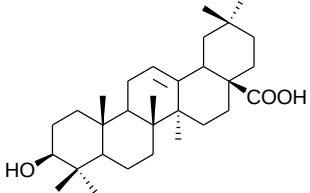
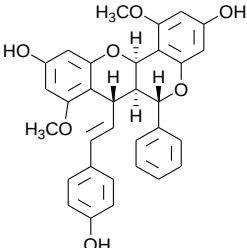
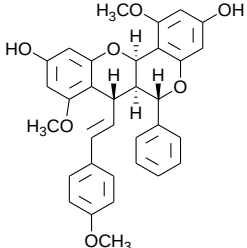
3.4 Gênero *Fridericia* com Potencial Medicinal

Fridericia (sin.: *Arrabidaea*) é um dos gêneros botânicos da família Bignoniaceae, que abrange cerca de 70 espécies. O Brasil é considerado o centro de diversidade desta família, ocorrendo em quase todos os estados do Brasil, distribuindo-se de Norte a Sul. Popularmente, plantas deste gênero são conhecidas como mato queimado, cipó una, santo cipó, panga e pariri (NASCIMENTO et al., 2022).

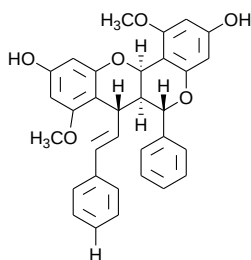
Na medicina tradicional, diversas atividades biofarmacológicas são atribuídas às espécies pertencentes a esse gênero, entre elas, ação antiinflamatória e adstringente (*A. chica*), ação antifúngica (*A. bilabiata*), antioxidante e anti-malária (*A.*

samydoides), antiviral e antitumoral (*A. pulchra*) (GONZALEZ et al., 2000; ALCERITO et al., 2002; PAULETTI et al., 2003; ALVES et al., 2010; BRANDÃO et al., 2013; ALVARENGA et al., 2015). Além disso, a atividade de plantas pertencentes ao gênero *Arrabidaea* contra protozoários da ordem kinetoplastida também é descrita na literatura. O extrato etanólico de *A. triplinervia* mostrou atividade contra *Trypanosoma cruzi* (LEITE et al., 2006). O extrato de *A. chica* também apresentou atividade tripanocida provocando lise nas formas tripomastigotas de *Trypanosoma cruzi*, além de atividade antileishmanial (BARBOSA et al, 2008).

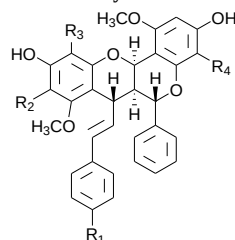
Tabela 1. Estrutura e propriedades antiparasitária de compostos isolados do gênero *Fridericia* (sin.: *Arrabidaea*)

Nome da Espécie	Parte da Planta	Nome e estrutura da substância isolada	Atividade biológica	Referência
<i>A. samydoides</i> , <i>A. pulchra</i> e <i>A. triplinervia</i>	Folhas e caule	 Ursolic acid	Tripanocida	Pauletti et al., 2003 Brandão et al., 2013, Alvarenga et al., 2012 e Leite et al., 2006
<i>A. pulchra</i> e <i>A. triplinervia</i>	Partes aéreas	 Oleanolic acid	Tripanocida	Alvarenga et al., 2012 e Leite et al., 2006
<i>A. brachypoda</i>	Raízes	 Brachyidin 1	Leishmania	Rocha et al., 2019 e Nunes et al., 2020
<i>A. brachypoda</i>	Raízes	 Brachyidin 2	Leishmania	Rocha et al., 2019 e Nunes et al., 2020

A.
brachypoda Raízes



Brachyidin 3



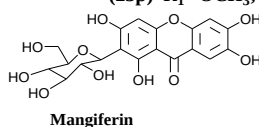
Leishmania Rocha et al.,
2019 e Nunes et
al., 2020

A.
brachypoda Raízes

Halogenated brachyidin (23a) $R_1=OH; R_2=H; R_3=Br; R_4=Br$
(23b) $R_1=OH; R_2=Br; R_3=Br; R_4=Br$
(23c) $R_1=OCH_3; R_2=H; R_3=Br; R_4=H$
(23d) $R_1=OCH_3; R_2=H; R_3=Br; R_4=Br$
(23e) $R_1=H; R_2=H; R_3=Br; R_4=Br$
(23f) $R_1=OCH_3; R_2=Br; R_3=Br; R_4=Br$
(23g) $R_1=H; R_2=Br; R_3=Br; R_4=Br$
(23h) $R_1=OH; R_2=H; R_3=I; R_4=I$
(23i) $R_1=OCH_3; R_2=H; R_3=I; R_4=H$
(23j) $R_1=H; R_2=H; R_3=I; R_4=H$
(23k) $R_1=OCH_3; R_2=H; R_3=H; R_4=I$
(23l) $R_1=OCH_3; R_2=H; R_3=I; R_4=I$
(23m) $R_1=H; R_2=H; R_3=I; R_4=I$
(23n) $R_1=OCH_3; R_2=H; R_3=Cl; R_4=H$
(23o) $R_1=H; R_2=H; R_3=Cl; R_4=H$
(23p) $R_1=OCH_3; R_2=H; R_3=Cl; R_4=Cl$

Tripanocida
e
Leishmania Neuenschwander
et al., 2020

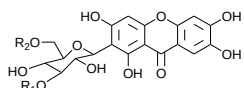
A.
patellifera Folhas

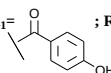


Mangiferin

*Plasmodium
falciparum* Martin et al.,
2008

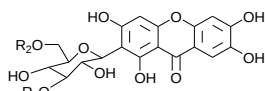
A.
patellifera Folhas

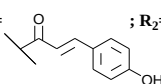


3'-O-p-hydroxybenzoylmangiferin $R_1=$  ; $R_2=H$

*Plasmodium
falciparum* Martin et al.,
2008

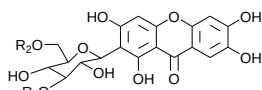
A.
patellifera Folhas

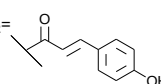


3'-O-trans-coumaroylmangiferin $R_1=$  ; $R_2=H$

*Plasmodium
falciparum* Martin et al.,
2008

A.
patellifera Folhas



6'-O-trans-coumaroylmangiferin $R_1=H$; $R_2=$ 

*Plasmodium
falciparum* Martin et al.,
2008

3.4.1 *Fridericia platyphylla* (CHAM.) L.G. Lohmann

Fridericia platyphylla (sin.: *Arrabidaea brachypoda*) é planta típica do Cerrado brasileiro, conhecida popularmente como cervejinha do campo, cipó-una ou tintureiro. É um vegetal arbustivo que possui até 70 cm de altura, abundantemente ramificado, com ramos cilíndricos, estriados glabros, com lentículas, ausentes de pseudo estípulas, com folhas simples e flores róseo-roxas em inflorescências terminais (NASCIMENTO et al., 2022) (Figura 1).



Figura 1. *Fridericia platyphylla*. Fonte: arquivo pessoal

Fitoquimicamente, essa espécie é conhecida como fonte de flavonoides, triterpenos, saponinas, taninos e polifenóis, já tendo sido isoladas e caracterizadas dezenove substâncias provenientes de folhas, flores, partes aéreas e raízes (NASCIMENTO et al., 2022). Na medicina tradicional, ela tem sido empregada para o tratamento de cálculos renais e dores nas articulações (artrite), no entanto, vários estudos têm demonstrado outros efeitos terapêuticos. Alcerito et al. (2002) relataram que quatro compostos flavonoides extraídos de folhas de *Fridericia platyphylla* tem atividade antifúngica contra *Cladosporium sphaerospermum*. Brandão et al. (2010) e de Sousa Andrade et al. (2020) relataram a atividade antiviral e antimicrobiana do extrato de caule e de frutas de *F. platyphylla*, respectivamente. Da Rocha et al. (2011) relataram atividades antiinflamatória e antinociceptiva do extrato etanólico isolado da raiz de *F. platyphylla*, confirmando o potencial farmacológico dessa espécie, sustentando o seu uso popular no tratamento de dores e inflamações, bem como atividades *in vitro* e *in vivo* anti *Trypanosoma cruzi* da fração diclorometano (FDCM) obtida do extrato hidroalcolico de raízes de *F. platyphylla* (da Rocha et al., 2014). Esta foi caracterizada, tendo sido identificados três flavonoides diméricos raros, nomeados de brachydinas (Figura 2), dos quais apenas dois apresentaram atividade

contra *Trypanosoma cruzi*, sendo menos tóxicos que benzonidazol, droga usada contra a doença de Chagas.

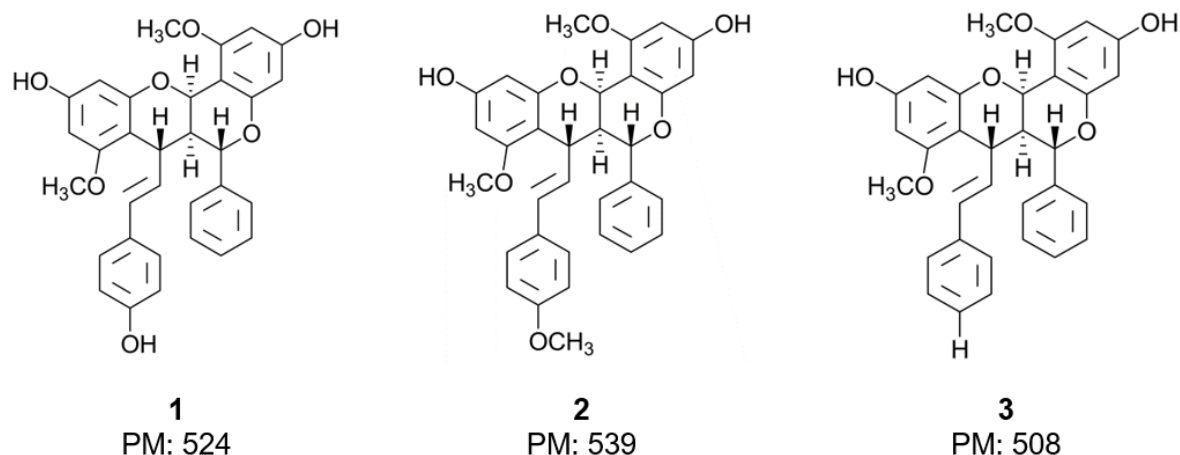


Figura 2. Estrutura molecular da Brachydina A (1), Brachydina B (2) e Brachydina C (3) e suas respectivas massas do íon molecular protonado. Fonte: da Rocha et al. (2014).

Pereira (2012) revelou potencial antileishmanial de *F. platyphylla* contra *L. amazonensis* das frações hexânica e acetato-etílica das folhas da planta. Mais recentemente, foi detectada atividade antileishmanial para cada um dos três flavonoides diméricos (brachydinas A, B e C) presentes na fração diclorometano (FDCM) das raízes de *F. platyphylla* (Rocha et al., 2019). Por outro lado, também foi demonstrada atividade antitumoral na FDCM total (Maciel-Silva et al., 2022; de Lima et al., 2022; Nunes et al., 2020).

3.5 Emprego de nanofármacos à base de plantas para o tratamento da Leishmaniose

Nas terapias medicamentosas sistêmicas convencionais, principalmente as que fazem uso das vias de administração oral e parenteral, são requeridas altas doses do fármaco para que, após a absorção e biodistribuição, a substância ativa atinja o tecido-alvo em concentrações terapêuticas. Nesse processo, quantidades significativas do fármaco são acumuladas em tecidos não alvos, desencadeando diversos efeitos adversos, muitos deles tóxicos (CHENTHAMARA, D. et al., 2020). A utilização de vias tópicas, em que o medicamento é aplicado diretamente no tecido-alvo, como pele e mucosas, nem sempre representa uma alternativa viável, uma vez que a absorção de fármacos nesses tecidos tende a ser limitada ou incompleta (CHOI, Y; HAN, H., 2019).

Um grande desafio para os pesquisadores na área farmacêutica está no desenvolvimento de medicamentos mais eficientes, que utilizem doses menores do fármaco e que sejam capazes de direcioná-lo exclusivamente ao local de ação pretendido, sem se acumular em outros tecidos, evitando-se efeitos adversos (AGRAHARI; HIREMATH, 2017). Outro importante desafio consiste na liberação progressiva do fármaco durante longos períodos, de forma que se reduza a necessidade de aplicação do medicamento repetidas vezes ao longo do dia, mantendo-se níveis eficazes e seguros do fármaco em seu local de ação durante todo o período de tratamento (SUN; YANG; TENG, 2020).

Nos últimos anos, vislumbrou-se na nanotecnologia uma possibilidade real de desenvolver medicamentos alvo-específicos mais eficazes e seguros. A nanotecnologia farmacêutica está relacionada ao desenvolvimento, caracterização e aplicação de sistemas em escala nanométrica (REGIS et al., 2021), e possuem como característica proporcionar ao fármaco a sua liberação controlada, possibilitando dessa forma que o mesmo, seja entregue num receptor específico mantendo suas concentrações plasmáticas em níveis constantes, por um período controlado (MELO et al., 2020; DIAS et al., 2021).

Na área farmacêutica, existem inúmeros estudos sobre a aplicação desta nova tecnologia, que evidenciam a eficácia de nanomedicamentos, sendo considerado uma possível ferramenta para o tratamento de diversas doenças, trazendo dessa forma grandes benefícios para a saúde humana, por meio do carregamento eficiente de fármacos com a liberação controlada e como também a diminuição da resistência de alguns medicamentos (LUNA-HERRERA et al., 2021; PITTA et al., 2021).

No que diz respeito ao tratamento da leishmaniose, a nanotecnologia vem desempenhando um papel crucial empregando dois métodos distintos. O primeiro método envolve o desenvolvimento de sistemas de liberação de nanofármacos para os medicamentos convencionais amplamente utilizados. Esta abordagem tem recebido considerável atenção na pesquisa de desenvolvimento de medicamentos e oferece uma das terapias mais promissoras contra a leishmaniose, graças às melhorias nas propriedades farmacocinéticas (AKBARI; ORYAN; HATAM, 2017). Além disso, esse sistema de liberação de medicamentos aprimora a eficácia terapêutica ao reduzir a toxicidade e afetar positivamente o comportamento do medicamento no organismo, incluindo sua absorção, distribuição e eliminação (VYAS; GUPTA, 2006). Portanto, os sistemas de liberação de nanofármacos proporcionam

alta eficácia, direcionamento preciso, baixa toxicidade, concentrações elevadas, liberação controlada e prolongamento da permanência na circulação sanguínea (DE CARVALHO et al., 2013). Normalmente, a entrega por meio de nanocarreadores aumenta a biodisponibilidade e protege os medicamentos contra o metabolismo, prolongando sua permanência nos órgãos do corpo, como fígado, rins e baço, o que resulta em intervalos mais espaçados entre as doses (GERSHKOVICH et al., 2009).

A segunda abordagem para a formulação de medicamentos envolve a nanonização dos medicamentos. As nanopartículas são fagocitadas pelos macrófagos, tornando-se alvos específicos para a *Leishmania* dentro dessas células (KUMAR et al., 2015). As nanopartículas são amplamente utilizadas em diagnósticos e tratamentos de doenças devido à sua grande área de superfície e propriedades especiais em comparação com formas convencionais ou tamanhos maiores (QASIM et al., 2014).

Contudo, mesmo com avanços no que diz respeito as quimioterapias atuais no tratamento da leishmaniose e usos da nanotecnologia, elas apresentam uma série de limitações como alto custo, toxicidade, desenvolvimento de resistência e muitos outros efeitos adversos indesejáveis. Portanto, o desenvolvimento de outras terapias é importante no tratamento dessa infecção (JAIN, K.; JAIN, N., 2013; BEZERRA et al., 2022).

A utilização de plantas medicinais na medicina tradicional tem uma longa história e muitas dessas plantas foram identificadas como fontes promissoras de compostos bioativos para a produção de novos medicamentos a partir de fitocomplexos (DOS SANTOS et al., 2022). Nos últimos anos, a utilização de fitoterápicos pela população brasileira tem crescido, o que pode ser atribuído a dois principais fatores. O primeiro deles está relacionado aos avanços científicos, que possibilitaram o desenvolvimento de fitoterápicos comprovadamente seguros e eficazes, já o segundo fator diz respeito à crescente tendência da população em buscar terapias menos agressivas e mais voltadas para a atenção primária à saúde (BRUNING; MOSEGUI; VIANNA, 2012).

A diversidade química dos óleos, extratos e frações de compostos vegetais os torna farmacologicamente relevantes para uso como fármacos, e muitos isolados químicos de produtos naturais já demonstraram considerável atividade antiparasitária, avaliada através de estudos *in vitro* e *in vivo*, frente a espécies de *Leishmania* (KAYSER; KIDERLEN; CROFT, 2003). Metabólitos secundários como alcaloides,

esteroides, terpenos, cumarinas e flavonoides, entre outros, revelaram eficácia e seletividade contra espécies de *Leishmania* (CHEUKA et al., 2016; GHODSIAN et al., 2020; CORTES et al., 2020). No entanto, a baixa solubilidade intrínseca em água de derivados vegetais, a instabilidade, baixa biodisponibilidade e possibilidade de ocorrência de efeitos colaterais indesejados quando administrados em sua forma natural são obstáculos para o desenvolvimento de um produto terapêutico à base de plantas (RIBEIRO et al., 2014).

Nesse contexto, o uso de sistemas nanoestruturados para produtos naturais tem se destacado devido às vantagens como melhora da farmacocinética, solubilidade de substâncias lipofílicas (como extratos vegetais) e proteção de substâncias terapêuticas contra agentes externos, e nos últimos anos, vem proporcionando novas abordagens no tratamento da leishmaniose (RAI et al., 2018). Além disso, sistemas nanoestruturados podem ser explorados em várias vias de administração, como topicamente, para melhorar a permeabilidade da pele, bem como oral ou parenteral, para entregar o fármaco aos tecidos-alvo (CARNEIRO et al., 2012; SANTOS et al., 2018).

3.6 Nanocarreadores à base de plantas e seus usos no tratamento da Leishmaniose

Os nanocarreadores (NC) são nanoestruturas biocompatíveis e inertes com diâmetro médio variando de 1 a 100 nm, associados ou envoltos a um princípio ativo, sendo utilizados como veículo de liberação de nanofármacos e possuem o papel de alterar propriedades farmacocinéticas, por meio do melhor desempenho da biodisponibilidade e meia-vida do fármaco (MELO et al., 2020; LUNA-HERRERA et al., 2021).

Esses NC são classificados por sua estrutura que pode ser orgânica ou inorgânica, sendo empregados como sistemas de liberação controlada, que permite a liberação do fármaco no organismo de maneira gradual, permanecendo em níveis plasmáticos terapêuticos, possibilitando a diminuição do número de administração do medicamento, sendo possível a redução das reações adversas. (LUNA-HERRERA et al., 2021).

Dentre as principais nanoestruturas à base de plantas empregadas para o tratamento da leishmaniose estão: nanoemulsões, lipossomas, nanopartículas

lipídicas, nanopartículas poliméricas e nanopartículas metálicas (DOS SANTOS et al., 2022; REGISTRE et al., 2023).

3.6.1 Nanoemulsões

Nanoemulsões (NEs) são sistemas constituídos por líquidos imiscíveis onde um deles é disperso no outro (emulsão) na forma de pequenas gotículas com tamanhos de partículas variando de 20 a 500 nm (GUPTA et al., 2016) (Figura 3). Essa imiscibilidade cria uma tensão na interface entre os líquidos, levando à instabilidade termodinâmica do sistema. Para isso, utilizando surfactantes e co-surfactantes, mesmo em baixas concentrações, é possível garantir estabilidade cinética, retardando a sedimentação ou coalescência das gotículas (KUMAR et al., 2019).

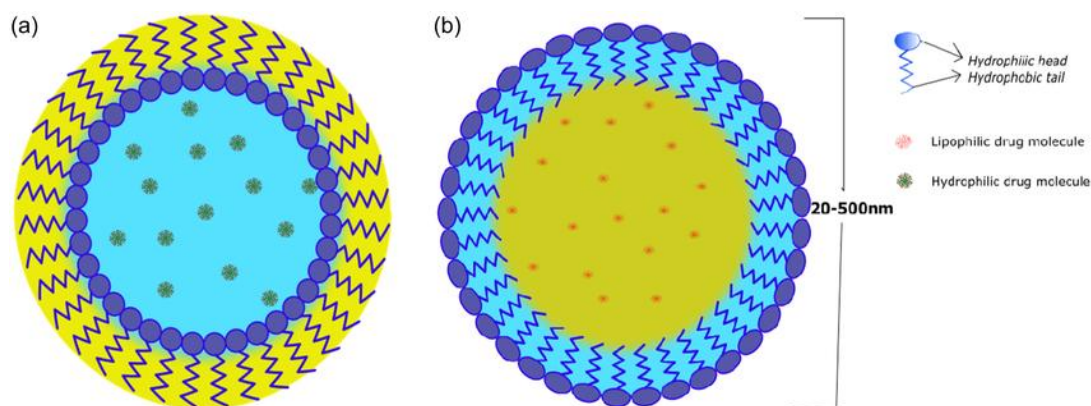


Figura 3. Estrutura da Nanoemulsão (NE) (a) NE água em óleo (W/O), (b) NE óleo em água (O/W). Fonte: Jamir et al., 2023 (DOI: 10.1002/bit.28590)

O NE tem sido uma alternativa para viabilizar o uso de substâncias insolúveis ou pouco solúveis em água, como derivados vegetais, apresentando-se como sistemas promissores para a liberação eficiente de fármacos (CAMPOS; RICCI-JÚNIOR; RICCI-JÚNIOR, 2012). Além disso, o tamanho reduzido das gotículas permite maior contato superficial, facilitando melhor penetração de princípios ativos à base de plantas, e confere diversas vantagens às formulações farmacêuticas, como melhora da farmacocinética, biodistribuição de agentes terapêuticos, solubilidade de substâncias lipofílicas, proteção de substâncias ativas contra o meio externo e possibilidade de uso em diferentes vias de administração (PRASAD et al., 2018). A tabela 2 resume alguns estudos sobre o uso de NE como agente leishmanicida.

Tabela 2. Nanoemulsões carregadas com ativos vegetais como agentes leishmanicidas

Espécie / Derivado vegetal	Cepa Leishmania	Estágio	IC ₅₀ (µg·mL ⁻¹)	Resultado In Vivo	Toxicidade
<i>Pterodon emarginatus</i> vogel / Frutas - oleorresina	<i>L. amazonensis</i>	Amastigota	n.d.	Diminuição do diâmetro da lesão; melhora dos parâmetros histopatológicos, redução da carga parasitária e redução dos níveis de citocinas.	Sem efeito citotóxico in vitro
<i>Pterodon pubescens</i> benth / Frutas – extratos	<i>L. amazonensis</i>	Amastigota	1,9 ± 0,30	n.d.	Citotoxicidade moderada contra J774
<i>Copaífera paupera</i> / Troncos - oleorresina	<i>L. amazonensis</i>	Promastigota	62,5 ± 8,3	n.d.	n.d.
	<i>L. infantum</i>		65,9 ± 8,8		
<i>Copaífera</i> sp. Lineu / Óleo essencial	<i>L. amazonensis</i>	Promastigota	18 ± 0.16 (24h)	Diminuição do desenvolvimento de lesões, redução da carga parasitária no fígado e baço.	Baixa toxicidade in vitro contra macrófagos
	<i>L. infantum</i>		16 ± 0,9 (24h)		
	<i>L. amazonensis</i>	Amastigota	Diminuição do IF (~96%)		
	<i>L. infantum</i>		Diminuição do IF (~90%)		
<i>Carapa guianensis</i> Aublet / Óleo essencial	<i>L. amazonensis</i>	Promastigota	590 ± 23 (24 h)	Diminuição do desenvolvimento de lesões, redução da carga parasitária no fígado e baço, e melhora das características histopatológicas.	Baixa toxicidade in vitro contra macrófagos
	<i>L. infantum</i>		366 ± 21 (24 h)		
	<i>L. amazonensis</i>	Amastigota	Diminuição do IF (~90%)		
	<i>L. infantum</i>		Diminuição do IF (~50%)		
<i>Lavandula angustifolia</i>	<i>L. maior</i>	Promastigota	0.11	n.d.	Baixa toxicidade in vitro contra J774
		Amastigota	0.06		

Legenda: concentração inibitória (IC₅₀); índice de infecção (IF); não determinado (n.d.); macrófagos celulares (J774). Fonte: dos Santo et al., 2022.

3.6.2 Lipossomas

Os lipossomas (LPs) são nanovesículas esféricas frequentemente compostas por fosfolipídios e surfactantes que se organizam espontaneamente em bicamadas (Figura 4). Nas bicamadas, as moléculas lipídicas individuais estão dispostas de forma ordenada, com suas caudas hidrofóbicas voltadas para dentro e seus grupos polares voltados para o meio aquoso e o meio fora do lipossomo (BOZZUTO; MOLINARI, 2015). Devido à possibilidade de carregar tanto drogas hidrofílicas (dispersas no núcleo aquoso ou adsorvidas na superfície) quanto lipofílicas (aprisionadas na bicamada lipídica), os LPs são considerados sistemas de liberação de fármacos de ampla aplicação (AIRES FERNANDES et al., 2021). Além disso, são estruturas

versáteis, pois suas características como tamanho, lamelaridade (número de bicamadas), superfície, fluidez e composição podem ser modificadas de acordo com os requisitos farmacotécnicos e farmacológicos necessários para o transporte da substância de interesse (KIM; JEONG, 2021).

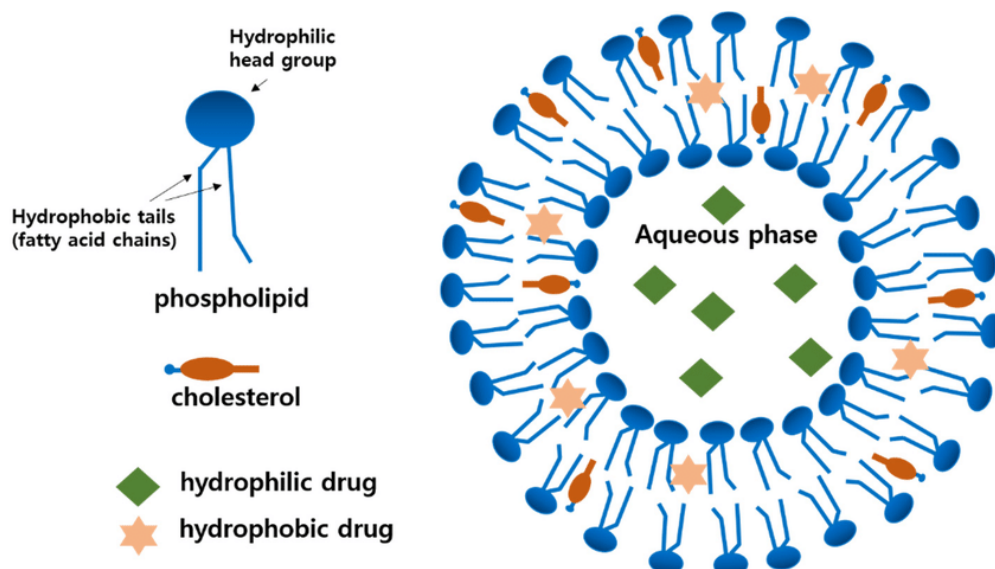


Figura 4. Estrutura de lipossomas convencionais encapsulando drogas hidrofílicas e hidrofóbicas. Fonte: Lee, 2020. (DOI:10.3390/pharmaceutics12030264)

O uso de lipossomas como sistemas carreadores foi proposto pela primeira vez em 1971 por Gregoriadis. Desde então têm sido estudados no tratamento de diversas doenças infecciosas e parasitárias (BATISTA; CARVALHO; MAGALHÃES, 2007). São amplamente estudados como sistema de liberação de fármacos para o tratamento da leishmaniose, uma vez que tendem a ser fagocitados por células do sistema mononuclear fagocítico. Isso pode ser uma vantagem no tratamento da doença, sabendo que os parasitas da *Leishmania* residem nessas células (ORTEGA; GIORGIO; DE PAULA, 2017). A tabela 3 apresenta um resumo de alguns trabalhos sobre o uso de lipossomas a base de plantas utilizados no tratamento da leishmaniose.

Tabela 3. Lipossomas carregadas com ativos vegetais como agentes leishmanicidas.

Espécie / Derivado vegetal	Cepa <i>Leishmania</i>	Estágio	IC ₅₀ (µg·mL ⁻¹)	Resultado In Vivo	Toxicidade
<i>Berberis vulgaris</i> e <i>Berberis aristata</i> / Berberina	<i>L. infantum</i>	Promastigota	6.8	O LP aumentou o acúmulo no fígado e baço; redução da carga parasitária (até 99%)	Redução de sete vezes na toxicidade para macrófagos
		Amastigota	1.4		
<i>Curcuma longa</i> / Córtex -	<i>L. amazonensis</i>	Promastigota	5.5	n.d.	n.d.

extrato metanólico bruto					
<i>Curcuma longa</i> / Curcumina	<i>L. maior</i>	Promastigota	2.33	n.d.	Linha celular HFF tratada com nanolipossomas demonstrou biocompatibilidade
<i>Amburana cearensis</i> / Derivado cumarínico	<i>L. maior</i>	Promastigota	Variou de 10 a 15	Espessura reduzida do coxim plantar e menor carga parasitária linfonodal em comparação com camundongos não tratados	A formulação do nanolipossomo apresentou menor toxicidade para a célula hospedeira J774

Legenda: Lipossoma (LP); concentração inibitória (IC₅₀); não determinado (n.d.); células fibroblásticas primárias do prepúcio humano (HFF); célula de macrófagos (J774). Fonte: dos Santo et al., 2022.

3.6.3 Nanopartículas Lipídicas

As nanopartículas lipídicas podem ser de dois tipos, as nanopartículas lipídicas sólidas (NLS) e as nanopartículas lipídicas carreadoras (NLC) (Figura 5).

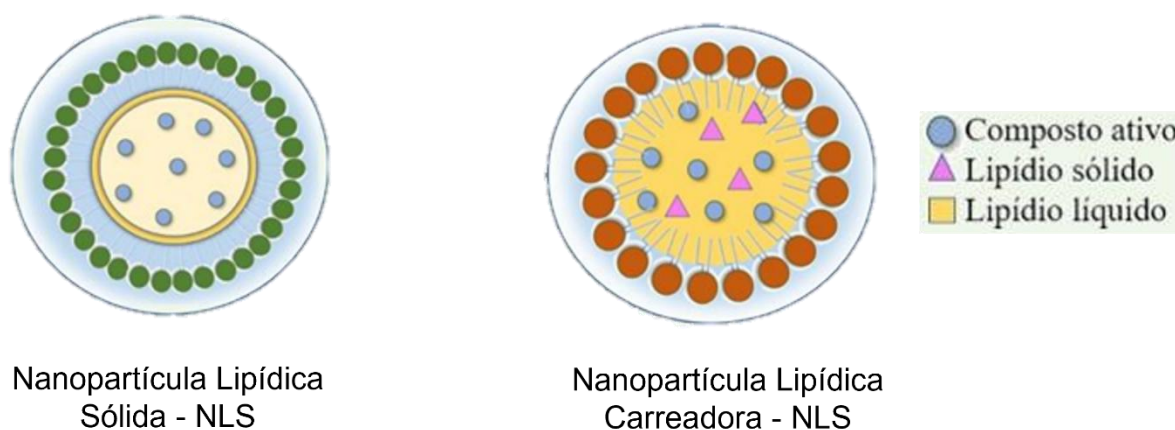


Figura 5. Estrutura das Nanopartículas Lipídicas. Fonte: adaptado de Lima, Renzi e Campos, 2021. (DOI:10.34117/bjdv7n12-018)

Os primeiros relatos de nanopartículas lipídicas sólidas (NLS) datam do início da década de 1990, como uma alternativa aos carreadores coloidais convencionais – como lipossomas, micropartículas poliméricas e microemulsão – para os quais o principal objetivo era melhorar a biodisponibilidade oral e as propriedades biofarmacêuticas gerais de fármacos pouco solúveis em água. Os NLS são nanopartículas de núcleo sólido extensivamente estudadas na área farmacêutica como sistemas de liberação de fármacos, obtidos por um lipídio sólido disperso em fase aquosa dentro de surfactantes (PALIWAL et al., 2020).

São nanopartículas de tamanho reduzido que variam de 50 a 1000 nm compostas por lipídios sólidos à temperatura ambiente e corporal e estabilizados por surfactantes (MEHNERT; MÄDER, 2012; GHASEMIYEH; MOHAMMADI-SAMANI, 2018). Os lipídios utilizados incluem triglicerídeos (tristearina), ácidos graxos (ácido esteárico, ácido palmítico), esteroides (colesterol) e ceras (palmitato de cetilo), que são fisiologicamente bem tolerados. Diferentes surfactantes e suas combinações (Pluronic F68, lecitina, Tween 80, Tween 20) são usados como estabilizantes de dispersão lipídica (YOON; PARK; YOON, 2013).

Dentre as vantagens do NLS, destacam-se: a possibilidade de liberação do fármaco no local de ação alvo, proteção do fármaco contra rápida degradação, alta concentração nos tecidos-alvo, maior estabilidade, baixa toxicidade, larga escala e baixo custo de produção. Eles também garantem a possibilidade de incorporar drogas lipofílicas e hidrofílicas (a incorporação deve depender da capacidade do fármaco e dos lipídios de formar uma mistura homogênea e da estrutura da matriz lipídica sólida) (WILCZEWSKA et al., 2012). No entanto, o NLS apresenta algumas limitações, como a eficiência limitada do encapsulamento do fármaco e a expulsão do fármaco carregado durante o armazenamento. O mecanismo que explica esse fenômeno afirma que, durante o armazenamento, ocorre uma transição polimórfica para uma forma cristalina mais ordenada e de baixa energia, limitando o espaço livre para a deposição de moléculas de fármacos, o que leva à expulsão do material encapsulado (CARNEIRO; DOS SANTOS 2020).

Já as nanopartículas lipídicas carreadoras (NLC) são a segunda geração de carreadores lipídicos que surgiram por volta dos anos 2000 como uma alternativa para superar as limitações associadas aos NLS (JANSOOK; FÜLÖP; RITTHIDEJ, 2019). Este sistema pode ser obtido substituindo-se uma fração de lipídio sólido por um óleo (que é um lipídio líquido à temperatura ambiente) que forma uma matriz lipídica complexa. O lipídio líquido promove maior grau de desorganização da matriz, permitindo que maiores quantidades de fármaco sejam dissolvidas, além de prevenir o extravasamento do fármaco durante o armazenamento, devido aos fenômenos de recristalização observadas nas NLS (SALVI; PAWAR, 2019).

Três tipos de NLC podem ser formados de acordo com a composição das misturas lipídicas e a organização da matriz lipídica no processo de preparação. A primeira, denominada "NLC imperfeita", consistia em uma mistura de glicerídeos compostos por diferentes ácidos graxos, o que leva a imperfeições cristalinas, de

modo que uma alta carga de fármacos pode ser alcançada devido ao maior espaço para sua acomodação. O segundo, "NLC tipo amorfo" formado pela mistura de lipídios sólidos com lipídios líquidos especiais (por exemplo, hidroxi octacosenil estearato de hidroxi, migliol) tem uma matriz não cristalina e, portanto, impede a expulsão do fármaco carregado. O terceiro tipo, conhecido como "NLC múltipla", é uma dispersão de lipídios líquidos/lipídios sólidos/água. Forma pequenos compartimentos oleosos onde a droga é dispersa (JAISWAL; GIDWANI; VYAS, 2016; BELOQUI et al., 2017; CARNEIRO; DOS SANTOS 2020). Algumas vantagens apresentadas pela NLC incluem baixa toxicidade, biodegradabilidade, liberação prolongada do fármaco, capacidade de uso em diferentes vias de administração, facilidade de produção em larga escala, entre outras (JAISWAL; GIDWANI; VYAS, 2016). A tabela 4 mostra os derivados vegetais carregados de NLS e NLC para o tratamento da leishmaniose.

Tabela 4. Sistemas de liberação de matriz lipídica sólida (NLS e NLC) à base de plantas como agentes leishmanicidas.

Espécie / Derivado vegetal	Cepa Leishmania	Estágio	IC ₅₀ (µg·mL ⁻¹)	Resultado In Vivo	Toxicidade
<i>Ocotea duckei</i> Vattimo / Lignana de Yangambin	<i>L. amazonenses</i> e <i>L. chagasi</i>	Promastigota	20	n.d.	A NLS carregada com Yangambin reduz os efeitos tóxicos do yangambina livre em macrófagos (BMDM)
Ácido ursólico	<i>L. infantum</i>	Amastigota	n.d.	A CLN apresentou a menor carga parasitária e atividade superior ao ácido ursólico isolado. Sem danos aos rins e fígado.	Não foram observadas alterações histológicas ou bioquímicas em hamsters saudáveis tratados com a NLC
<i>Origanum vulgare</i> / Carvacrol	<i>L. amazonensis</i>	Promastigota	28.2	n.d.	IC ₅₀ para células THP1 saudáveis foi quase três vezes maior que o IC ₅₀ para promastigotas de <i>L. amazonensis</i> ; A formulação foi considerada segura
		Amastigota	19.65		
<i>Cedar threes</i> / Cedrol	<i>L. donovani</i>	Promastigota	CLN-CRD melhorou a atividade anti-leishmania do cedrol — 0,85 a 1,5 vezes maior IC ₅₀ do que o cedrol livre	A CLN-CRD reduziu em mais de 99% a carga parasitária no fígado e baço (duas doses orais a cada 7 dias). A CLN-CRD apresentou eficácia antileishmania superior à	NLC-CRD foram internalizados com sucesso por macrófagos sem causar qualquer dano
		Amastigota	A CLN-CRD foi duas vezes mais seletiva para		

			amastigotas intracelulares	miltefosina livre nas mesmas doses.	
<i>Bixa Orellana</i> L. / Fração do óleo das sementes	<i>L. maior</i>	Amastigota	Captação da droga CLN, resultando na eliminação do parasita na célula	n.d.	NLC carregado com óleo de semente a 4% (p/p) apresentou CI_{50} de 153,6 e 123,4 mg/mL para 3T3 e HaCaT, respectivamente. A eficácia contra <i>L. maior</i> (concentrações 2 e 5 µg/mL) foi consideravelmente menor do que as concentrações que causaram toxicidade para 3T3 e HaCaT.

Legenda: concentração inibitória (IC_{50}); célula de fibroblastos (3T3); células de queratinócitos (HaCaT); macrófagos derivados da medula óssea (DMO); linhagem celular monocítica humana (THP-1); não determinado (n.d.); nanopartícula lipídica sólida (NLS); nanopartícula lipídica carreadora (NLC); cedrol (CDR). Fonte: dos Santo et al., 2022.

3.6.4 Nanopartículas poliméricas

Nanopartículas poliméricas são partículas coloidais com diâmetro de 1 a 1000 nm. A matriz polimérica pode ser formada a partir de polímeros naturais ou sintéticos (como o ácido poli (lactídeo-co-glicólico) (PLGA), ácido polilático (PLA), ácido poliglicólico (PGA), policaprolactona (PCL), poli(d,l-lactídeo), quitosana e polietilenoglicol (PEG)), que são usados como sistemas carreadores de fármacos e outras moléculas (proteínas, antígenos, macromoléculas). Os polímeros sintéticos têm boa biodegradabilidade e biocompatibilidade e alguns são aprovados pela Food and Drug Administration (FDA) dos EUA e pela Agência Europeia de Medicamentos (EMA) para uso farmacêutico, como PLGA, PLA e PGA (SCHAFFAZICK et al., 2003; ZIELIŃSKA et al., 2020).

As nanopartículas poliméricas são uma denominação geral que se refere tanto às nanocápsulas quanto às nanoesferas, diferenciando-se por sua organização estrutural, composição e presença ou ausência de óleo em suas composições (Figura 6). As nanoesferas são formadas por uma matriz polimérica, onde os fármacos são homogeneamente dispersos ou adsorvidos. Por outro lado, as nanocápsulas são formadas por um núcleo oleoso circundado por uma membrana polimérica. A droga pode ser dissolvida no núcleo oleoso ou adsorvida na membrana polimérica (SCHAFFAZICK et al., 2003; ZIELIŃSKA et al., 2020).

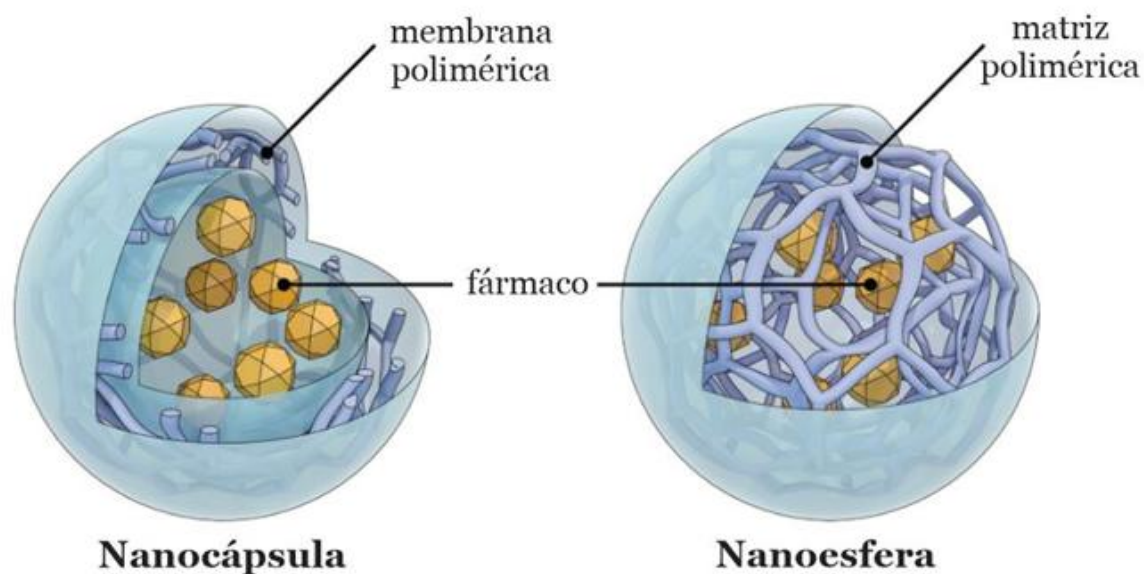


Figura 6. Estrutura das Nanopartículas Poliméricas. Fonte: adaptado de Suffredini; East; Levy, 2014. (DOI: 10.3174/ajnr.A3543)

A escolha da nanopartícula polimérica depende do seu método de obtenção, propriedades químicas, físicas e características da substância ao qual será encapsulada. A preparação pode ser realizada de dois métodos: polimerização interfacial de monômeros dispersos, disperso de polímeros pré-formados (emulsificação- evaporação, nanoprecitado, emulsificação- difusão, salting-out) essas técnicas utilizam uma solução orgânica em fase interna e uma fase aquosa externa, sendo comum apresentar agentes estabilizadores durante a sua preparação, onde esses métodos de obtenção são empregados para fármacos de natureza lipofílica (BEZERRA et al., 2022).

Durante a última década, sistemas de liberação de fármacos à base de polímeros têm sido utilizados para melhorar o desempenho de fármacos no tratamento da leishmaniose. No mesmo sentido, o uso combinado de NPs com produtos naturais anti-leishmaniose tem sido alvo de pesquisas para o desenvolvimento de novos tratamentos, uma vez que esses nanocarreadores podem penetrar nas células de macrófagos e atingir o parasita infeccioso, possibilitando liberação direcionada e eficiente (TIUMAN et al., 2011; SALEEM et al., 2019). Além disso, compostos naturais têm demonstrado a capacidade de gerar alterações nas estruturas celulares, inclusive em nível mitocondrial, levando à morte das formas promastigotas e amastigotas intracelulares (JIANG et al., 2017; DO NASCIMENTO et al., 2016).

Alguns estudos que utilizaram nanopartículas poliméricas no tratamento da leishmaniose estão resumidos na tabela 5.

Tabela 5. Nanopartículas poliméricas de base vegetal como agentes leishmanicidas.

Espécie/Derivado vegetal	Cepa Leishmania	Estágio	IC ₅₀ (µg·mL ⁻¹)	Resultado In Vivo	Toxicidade
<i>Apis mellifera</i> / Extrato de própolis vermelho	<i>L. braziliensis</i>	Promastigota	31.2	n.d.	n.d.
<i>Ésculo hipocastanum</i> / β-aescina	<i>L. infantum</i>	Amastigota	1.04	n.d.	Os efeitos líticos da β-aescina sobre as células MRC-5 investigadas foram bloqueados pelo encapsulamento em NPs PLGA (17,87 µg·mL ⁻¹)
Ácido betulínico	<i>L. maior</i>	Promastigota e amastigota	n.d.	Cicatrização. Diminuição da carga parasitária na lesão, fígado e baço	A maior dose de NPs BA 20 mg/kg: sem alterações nas concentrações séricas de UREIA, AST, ALT e ALP; ausência de alterações morfológicas no fígado, rins e baço
<i>Matricaria chamomilla</i> L. / óleo essencial	<i>L. amazonenses</i>	Promastigota	7.2	n.d.	O encapsulamento do óleo essencial reduz os efeitos tóxicos sobre as linhagens celulares HaCat e macrófagos
		Amastigota	14.3		
<i>Nigella sativa</i> / Óleo fixo	<i>L. infantum</i>	Promastigota	159	n.d.	Sem efeito citotóxico in vitro
		Amastigota	102		

Legendas: concentração inibitória (IC₅₀); aspartato transaminase (AST); alanina transaminase (ALT); fosfatase alcalina (ALP); nanopartículas de ácido betulínico (NPs BA); não determinado (n.d.). Fonte: dos Santo et al., 2022.

3.6.5 Nanopartículas metálicas

Nanopartículas metálicas e de óxidos metálicos são partículas de tamanho nanométrico (1 a 100 nm), com formas distintas como esferas, cilindros, cubos, triangulares, hexagonais ou bastões, com um núcleo metálico composto por um metal inorgânico ou óxido metálico que geralmente é coberto por uma casca composta de material orgânico ou inorgânico ou óxido metálico (Figura 7). Suas características optoeletrônicas e físico-químicas estão relacionadas à sua composição, tamanho, forma, cristalinidade e estrutura (IRAVANI, 2011; ARVIZO et al., 2012). O tempo de ciclagem, o efeito de direcionamento e a capacidade dessas nanopartículas de atravessar as barreiras biológicas são parcialmente dependentes de seu tamanho, carga superficial e forma. As nanopartículas metálicas e de óxidos metálicos possuem tamanhos de partículas pequenos, o que lhes confere diferentes propriedades,

incluindo uma área superficial maior e bem definida, diferentes propriedades físicas, além de maior reatividade em comparação com seu material a granel. A grande área superficial fornece mais sítios reativos potenciais com alta energia de superfície, o que os transforma em potentes candidatos em sistemas de liberação de fármacos (Shnoudeh et al., 2019; Khan, 2020).

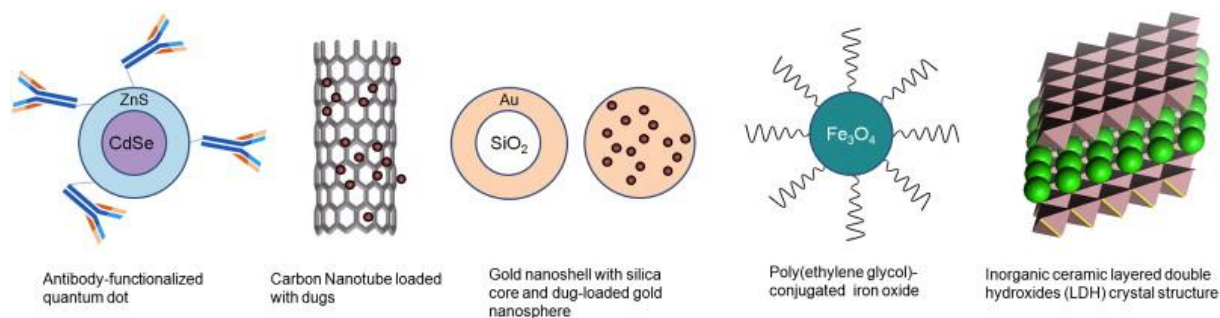


Figura 7. Estrutura das Nanopartículas Metálicas. Fonte: Huang et al., 2011. (DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2011.06.004>)

Vários métodos de síntese química, física e biológica são utilizados para preparar essas nanopartículas. Exemplos incluem redução química, irradiação gama, microemulsão, decomposição térmica, precipitação, processamento de micro-ondas, ablação a laser, atrito mecânico, deposição de sputtering, deposição química de vapor, litografia, método de poliol, deposição de vapor, sol-gel e método verde, entre outros. Em geral, a maioria dos métodos de síntese física e química precisam ser mantidos sob algumas condições físicas, como alta temperatura e vácuo, o que resulta em alta utilização de energia (Shnoudeh et al., 2019; Khan, 2020). Geralmente, eles experimentam problemas com a estabilidade de preparações de nanopartículas, controle do crescimento de cristais e agregação de partículas. Além disso, podem utilizar solventes tóxicos (por exemplo, n,n-dimetilformamida, hidrazina, boroidreto de sódio) que geram substâncias nocivas à saúde humana e ao meio ambiente, fatos que restringem sua aplicabilidade. Um método de síntese biológica de nanopartículas metálicas (síntese verde) utilizando extratos vegetais, microrganismos (bactérias, fungos, leveduras, algas, protozoários e vírus) e outros biomateriais é empregado como uma alternativa adequada para reduzir o perigo de métodos químicos e físicos, pois é considerado um método econômico, ecológico, simples, rápido e conveniente para uma produção em larga escala (IRAVANI, 2011; Shnoudeh et al., 2019; Khan, 2020). Alguns estudos que utilizam nanopartículas metálicas e de óxido metálico no tratamento da leishmaniose estão resumidas na tabela 6.

Tabela 6. Nanopartículas metálicas de base vegetal como agentes leishmanicidas.

Espécie / Derivado vegetal	Metal / Óxido metálico	Cepa Leishmania	Estágio	IC ₅₀ (µg·mL ⁻¹)	Resultado In Vivo	Toxicidade
<i>Nigella sativa</i> / Óleo essencial	TiAgNps	<i>L. tropica</i>	Promastigota e Amastigota	n.d.	n.d.	não citotóxico para macrófagos J774A.1
<i>Rhazya stricta decne</i> / Extrato aquoso	AuNPs	<i>L. tropica</i>	Amastigota	43	n.d.	biocompatível com macrófagos THP-1
<i>Olavo nana</i> Parede. ex Benth / Extrato aquoso - folhas	AgNPs	<i>L. tropica</i>	Promastigota	12.56	n.d.	mostrou-se atóxico para macrófagos e compatível com o ambiente biológico
			Amastigota	17.44		
	AuNPs		Promastigota	21.52		
			Amastigota	42.20		
<i>Rhamnus virgata</i> / Extrato de folhas	CoONPs	<i>L. tropica</i>	Promastigota	32.64	n.d.	compatibilidade com o meio biológico
			Amastigota	58.63		
<i>Euphorbia prostrata</i> / Extrato aquoso - folhas	AgNPs	<i>L. donovani</i>	Promastigota	3.89	n.d.	não citotóxico para macrófagos J774A.1
			Amastigota	14.94		
<i>Silybum marianum</i>	ZnONPs	<i>L. tropica</i>	Promastigota	246	n.d.	n.d.
<i>Mentha longifolia</i> (L.) L. / Extrato aquoso - folhas	AgNPs	<i>L. tropica</i>	Promastigota	8.73	n.d.	n.d.
<i>Moringa oleífera</i> / Extrato aquoso - folhas	AgNPs	<i>L. maior</i>	Promastigota	n.d.	tamanho da lesão e cicatrização completa após 14 dias	minimizou o efeito tóxico mediado por ROS
<i>Zingiber officinale</i> / Extrato aquoso – Rizhome	AgNPs	<i>L. maior</i>	Amastigota	2,35 (ppm)	n.d.	altas concentrações têm impactos mais tóxicos sobre os macrófagos RAW.264.7 (≥ 2.5 ppm)

Legenda: concentração inibitória (IC₅₀); nanopartículas de prata (AgNPs); nanopartículas de ouro (AuNPs); nanopartículas de óxido de cobalto (CoONPs); nanopartículas de óxido de zinco (ZnONPs); nanopartículas de dióxido de titânio dopadas com prata (TiAgNps); não determinado (n.d.). Fonte: dos Santo et al., 2022.

O desenvolvimento deste projeto foi estruturado em duas etapas distintas. A Etapla 1 dedicada a avaliar em modelos *in vitro* a FDCM (fração apolar rica em brachyquinas) da espécie *F. platyphylla* em culturas de Leishmanias, abordando o objetivo específico (a), realizada em parceria com Laboratório de Genética e Biologia

Molecular (LabGeM) e ensaios de docagem molecular relacionados ao objetivo específico (b), realizados em parceria com o Laboratório de Química Computacional, ambos da Universidade Federal do Maranhão. A Etapa 2 teve como foco o desenvolvimento e a caracterização de nanoformulações contendo a FDCM, correspondente ao objetivo específico (c), e realização dos testes *in vitro* para avaliar a toxicidade e a eficácia dos nanocompostos em culturas de Leishmanias, conforme o objetivo específico (d). Essa parte do projeto foi executada em parceria com o Laboratório de Nanotecnologia Ambiental do Instituto de Ciência e Tecnologia/Unesp Sorocaba e o Laboratório de Patologia e Imunoparasitologia (LPI) da Universidade Federal do Maranhão (UFMA), respectivamente.

Para facilitar a compreensão deste trabalho, as seções materiais e métodos e resultados e discussões foram organizadas de acordo com cada etapa.

4. Materiais e Métodos (Etapa 1)

4.1 Padrões, Solventes e Reagentes

Antimônio trivalente (Sb^{III}), antimonato de meglumina (MA; Sb^V) e anfotericina B (AMB) foram adquiridos da Sanofi Aventis (São Paulo, Brasil), Sigma-Aldrich (Munique, Alemanha) e Cristália (São Paulo, Brasil), respectivamente, com pureza mínima de 98%. Os reagentes relacionados à cultura celular foram obtidos da Gibco/Invitrogen (Massachusetts, EUA). Todos os outros produtos químicos foram adquiridos da Sigma-Aldrich (Munique, Alemanha) e da Merck (Munique, Alemanha).

4.2 Material Vegetal.

As raízes de *F. platyphylla* foram coletadas em abril de 2021 na fazenda Sant'Ana da Serra, João Pinheiro, Minas Gerais, Brasil. A planta foi identificada no ICEB do Herbário José Badine da Universidade Federal de Ouro Preto pela Prof^a. Maria Cristina Teixeira Braga Messias. Um exemplar (nº. 17935) foi depositado no Herbário da Universidade Federal de Ouro Preto, Brasil. A coleta foi realizada de acordo com as leis brasileiras relativas à proteção da biodiversidade (SisGen No. A451DE4).

4.3 Obtenção e Fracionamento do Extrato

O extrato e a fração foram obtidos conforme descrito por Rocha et al., 2014. Em resumo, as raízes de *F. platyphylla* foram secas e moídas em um moinho de facas. Posteriormente, as raízes em pó foram submetidas à percolação com etanol/água (7:3). Após a filtração, o extrato etanólico das raízes foi coletado e, em seguida, evaporado a seco sob pressão reduzida (40 ° C) para produzir o extrato bruto. Em seguida, o extrato etanólico foi diluído em H₂O e foram submetidos à partição líquido-líquido para obtenção das frações diclorometano e metanol/água. A fração diclorometano foi analisada usando o método de detecção de arranjo de fotodiodos de cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC-PDA) e LC-MS. Os métodos de caracterização química da fração são detalhados por Rocha et al., 2014.

4.4 Cultura celular

Macrófagos murinos RAW 264.7 foram fornecidos pelo Laboratório de Imunologia Aplicada ao Câncer, Universidade Federal do Maranhão, Brasil. As células foram cultivadas em meio RPMI 1640 suplementado com 5% de soro fetal bovino, 1% de estreptomicina e 1% de penicilina a pH 7,4. Os macrófagos foram mantidos a 37°C em incubadora com atmosfera umidificada e 5% de CO₂. As células em culturas com aproximadamente 80% de confluência foram coletadas utilizando o TrypLE™ Express, lavadas com PBS e suspensas em meio de cultura de células RPMI suplementado com 10% de soro fetal bovino, 1% de estreptomicina e 1% de penicilina.

4.5 Parasitas

As formas promastigotas de *L. infantum* (MHOM/BR/1974/PP75), *L. braziliensis* (MHOM/BR/1975/M2903) e *L. mexicana* (MNYC/BZ/1962/M377) foram cultivadas a 26°C em meio Schneider's Insect (Sigma-USA) suplementado com 10% de soro fetal bovino inativado (Gibco-USA), 1% de estreptomicina (Gibco-USA) e 1% de gentamicina (Sigma-Aldrich). Os ensaios foram realizados com culturas de protozoários com no máximo dez passagens de replicação *in vitro*.

4.6 Atividade anti promastigota

A atividade anti-promastigota foi avaliada para todas as espécies de *Leishmania* (*L. infantum*, *L. braziliensis* e *L. mexicana*) usando o ensaio MTT (Mosmann, 1983). As promastigotas foram cultivadas em placa de 96 poços e mantidas a 26°C em meio Insect de Schneider (conforme descrito no item 2.5). Um total de 1×10^5 parasitas/poço foram semeados e tratados com DCMF em um volume final de 200 µL. Os testes piloto determinaram as concentrações finais de DCMF (157 µg/mL, 78,5 µg/mL, 39,2 µg/mL, 19,6 µg/mL, 9,8 µg/mL e 4,9 µg/mL) utilizadas em cada ensaio. A anfotericina B (Cristália, Brasil) foi utilizada nas concentrações de 16 µg/mL, 8 µg/mL, 4 µg/mL, 2 µg/mL, 1 µg/mL e 0,5 µg/mL (para ensaios promastigotas) ou 0,5 µg/mL, 0,17 µg/mL, 0,06 µg/mL, 0,02 µg/mL e 0,01 µg/mL (para ensaios de amastigotas). O antimônio trivalente (Sigma-Aldrich, EUA) foi utilizado nas concentrações de 553,6 µg/mL, 276,8 µg/mL, 138,4 µg/mL, 69,2 µg/mL, 34,6 µg/mL e 17,3 µg/mL, enquanto o antimonato de meglumina (Sanofi Aventis, Brasil) foi utilizado nas concentrações de 90 µg/mL, 30 µg/mL, 10 µg/mL, 3,3 µg/mL e 1,6 µg/mL, como medicamentos antileishmanias de referência. O meio de cultura com *Leishmania* foi utilizado como controle negativo, e os poços contendo apenas meio de cultura serviram como controle em branco. Após 48 h, as placas foram centrifugadas a 3000 rpm, o meio foi descartado e 180 µl de meio e 20 µl de MTT (5 mg/mL) foram adicionados a cada poço para determinar a viabilidade do parasita. Após 3 h, 80 µl de SDS a 10% em HCl 0,01 N foram adicionados a cada poço para dissolver os cristais de formazan. A absorbância foi analisada usando um espectrofotômetro Epoch (BioTek®) em um comprimento de onda de 470 nm de acordo com a fórmula:

$$\% \text{ viabilidade} = \frac{DO_{\text{amostra}} - DO_{\text{branco}}}{DO_{\text{controle negativo}} - DO_{\text{branco}}} \cdot 100$$

Os resultados foram usados para calcular o IC₅₀ (concentração em µg/mL que inibe 50% do crescimento do parasita), determinado usando a curva de resposta à dose. Foram efetuados dois ensaios independentes e cada concentração foi avaliada em triplicata.

4.7 Atividade anti amastigota

Considerando que o DCMF foi eficaz contra as promastigotas das três espécies de *Leishmania*, o ensaio para amastigotas foi realizado apenas para uma espécie (*L. infantum*). Portanto, os macrófagos RAW 264,7 foram cultivados em uma placa de

cultura de 24 poços (1×10^5 células/poço, a 37°C e 5 % de CO_2). As células foram infectadas com promastigotas de *L. infantum* (15 parasitas:1 macrófago). Após 24 h, as células foram lavadas com PBS para remover as formas livres de parasitas. As células infectadas foram então submetidas a um tratamento de 24 horas usando as concentrações idênticas mencionadas anteriormente para DCMF, anfotericina B e antimonato de meglumina (conforme descrito no item 4.6). As células foram fixadas com panóptico rápido (Laboclin, Brasil) e montadas com Entellan® new (Merck, Alemanha) para análise em microscópio óptico (100x). Macrófagos infectados e não tratados foram incubados nas mesmas condições para serem usados como controles (100% de infecção). Duzentos macrófagos por lamínula foram analisados para calcular a porcentagem de macrófagos infectados (Tempone et al, 2004). Três experimentos foram conduzidos em duplicata.

4.8 Ensaio de viabilidade celular

Macrófagos murinos RAW 264,7 (1×10^5 macrófagos/poço) foram cultivados em uma placa de 96 poços a 37°C com 5% de CO_2 e tratados por 48 h com DCMF, anfotericina B e antimonato de meglumina nas mesmas concentrações descritas no item 4.6, em um volume final de 200 μL . Poços contendo células não tratadas foram utilizados como controles negativos, e poços sem células, contendo apenas meio de cultura, serviram como controles em branco. Após o tratamento de 48 h, 20 μL de MTT (5 mg/mL) foram adicionados à placa e incubados por 3 h. Posteriormente, 80 μL de SDS a 10% em HCl 0,01 N foram adicionados a cada poço para dissolver os cristais de formazan. A absorbância foi determinada conforme descrito anteriormente. Os resultados foram empregados para calcular o CC_{50} (concentração em $\mu\text{g}/\text{mL}$ que inibe 50 % da viabilidade celular) utilizando a curva dose-resposta. Dois ensaios independentes foram conduzidos em triplicata.

4.9 Índice de seletividade

Foi utilizada a seguinte fórmula para determinar o índice de seletividade (IS):

$$IS = \frac{\text{CC}_{50}}{\text{IC}_{50 \text{ amastigotas intracelular}}}$$
, onde CC_{50} representa a concentração citotóxica para 50% das células avaliadas no ensaio de viabilidade celular e IC_{50} representa a

concentração inibitória para 50% das formas amastigotas intracelulares, considerando a mesma substância (Makwali, et al., 2015).

4.10 Análise da genotoxicidade através do ensaio cometa

O ensaio Cometa foi realizado para avaliar os danos no DNA de acordo com Singh et al. (1988) e Tice et al. (2000). Macrófagos RAW 264.7 foram cultivados em placa de cultura de 24 poços (1×10^5 células/poço), a 37°C e 5% de CO₂. O tratamento ocorreu por 3 e 24 horas, onde as células foram expostas a 40µg/mL; 25µg/mL e 10µg/mL do FDCM. Os controles negativo, positivo e do veículo foram células não tratadas, H₂O₂ (10µl) e DMSO 0,5%, respectivamente. Após o tratamento, as células foram dissociadas com TrypLE™ Express (Gibco, Dinamarca), centrifugadas durante 10 minutos a 1200 rpm a 4°C e depois suspensas em 80µL de meio RPMI misturado com 100µL de agarose de baixo ponto de fusão (0,5%). Esta mistura foi transferida para uma lâmina pré-revestida com agarose de ponto de fusão normal a 1,5%. Em seguida, foram colocadas lamínulas sobre as lâminas e refrigeradas durante 5 minutos. Após solidificação, as lâminas foram imersas em solução de lise (2,5 M NaCl, 100 mM EDTA, 10 mM Tris, 10% dimetilsulfóxido, 1% Triton X-100, pH 10,0) e refrigeradas durante a noite a 4°C. Subsequentemente, as lâminas foram incubadas em solução alcalina (NaOH 10 M, EDTA 0,2 M e água destilada, pH 13,0) durante 30 minutos a 4°C, seguido de eletroforese a 25 V e 300 mA durante 25 minutos. As lâminas foram neutralizadas (0,4 M Tris/HCl, pH 7,5), secas à temperatura ambiente e fixadas em etanol a 100% durante 4 minutos. Cada lâmina foi corada com 30 µg/mL de brometo de etídio (20 µg/mL) e analisada num microscópio de fluorescência (BX51/BX52-Olympus; Japão), utilizando um filtro de 516-560nm e uma barreira de filtro de 590nm numa objetiva de 40x. Foram analisados 100 nucleóides, considerando o tamanho e a quantidade de DNA presente na cauda do cometa. O dano ao DNA foi classificado visualmente de acordo com a migração do fragmento (tamanho da cauda): classe 0 (nucleóide não danificado, ausência de cauda), classe 1 (nucleóide com cauda curta, menor que seu diâmetro), classe 2 (comprimento da cauda de uma a duas vezes o diâmetro do nucleóide), classe 3 (com cauda maior que duas vezes o diâmetro do nucleóide) e classe 4 (nucleóide maximamente danificado). A pontuação de danos foi obtida multiplicando o número de nucleóides em cada classe pelo valor da respectiva classe, utilizando a equação:

$$\text{Escore} = \frac{[(0 \times n_0) + (1 \times n_1) + (2 \times n_2) + (3 \times n_3) + (4 \times n_4)]}{\text{total do número de células}}$$

onde n é o número de nucleóides em cada classe.

4.11 Teste de Invasão

Os macrófagos RAW 264.7 foram cultivados em placa de cultura de 24 poços (1×10^5 células/poço, a 37°C e 5% de CO₂). As células foram infectadas com promastigotas de *L. infantum* utilizando uma proporção parasita/célula de 15:1. Após 4 horas, as células foram lavadas com PBS para remover as formas livres de parasitas. As células infectadas foram tratadas por 24 horas com FDCM (39,2µg/mL; 19,6µg/mL; 9,8µg/mL e 4,9 µg/mL), anfotericina B (8µg/mL; 4µg/mL; 2µg/mL e 1 µg/mL) e antimoniato de meglumina (138,4µg/mL; 69,2µg/mL, 34,6µg/mL e 17,3µg/mL). As células foram fixadas e coradas com panótico rápido (Laboclin, Brasil) e coladas com Entellan® new (Merck, Alemanha) para análise em microscópio ótico (100x). Foram examinadas cem células para determinar se estavam infectadas e o número de parasitas intracelulares (Ramírez-Macías, et al., 2012).

4.12 Teste de multiplicação

Os macrófagos foram semeados em placas de cultura de 24 poços com lamínulas circulares por 24 h (6×10^4 células/poço), 48 h (4×10^4 células/poço), 72 h (4×10^4 células/poço) e 96 h (2×10^4 células/poço) a 37 °C com 5 % de CO₂, com 24 horas extras iniciais para facilitar a adesão celular. As células foram infectadas com formas promastigotas de *L. infantum* na proporção de 15:1 (parasita/célula). Após 24 h, as células foram lavadas duas vezes com PBS para remover as formas livres de parasitas. O tratamento foi realizado nas mesmas concentrações descritas em 4.11. As células foram fixadas e coradas com panótico rápido (Laboclin, Brasil) e seladas com Entellan® novo (Merck, Alemanha) para análise em microscópio óptico (100x). Cem células foram analisadas para determinar o número de parasitas internalizados (Ramírez-Macías, et al., 2012).

4.13 Análise estatística

A normalidade dos dados foi analisada pelo teste de Kolmogorov-Smirnov. Foi realizada ANOVA para dados paramétricos seguido do pós-teste de Tukey e Kruskal

Wallis seguido do pós-teste de Dunn para dados não paramétricos, ambos adotando $p < 0,05$. As análises estatísticas e os gráficos foram feitos utilizando o software Prism® da GraphPad versão 6.00.

4.14 Previsão de estrutura

Primeiro, a estrutura cristalográfica do TIM de *Leishmania* foi obtida do Protein Data Bank com o código de acesso 2Y63 (Venkatesan et al., 2011). Em seguida, a sequência do tipo TIM de *Leishmania braziliensis* (*lb*TIM) e *Leishmania infantum* (*li*TIM) obtida do UniProtKB foi remodelada (Krieger et al., 2005) com a abordagem de homologia usando o programa Modeller (Fiser & Šali, 2003) com a estrutura cristalográfica como referência.

As estruturas *lb*TIM e *li*TIM modeladas foram minimizadas no Amber18 (Case et al., 2005) por 50.000 ciclos do método do algoritmo de descida mais acentuada seguido de 50.000 ciclos do método do gradiente conjugado. A análise do estado de protonação dos resíduos ionizáveis foi efetuada a pH neutro através do cálculo do pKa no PROPKA3, que está disponível no servidor PDB2PQR (Jurrus et al., 2018).

4.14.1 Docagem molecular (DM)

Para analisar o modo de ligação dos compostos bradydinas 1, 2 e 3 (Figura 2), foram efetuadas simulações de acoplamento molecular com o programa Autodock Vina (Schneidman-Duhovny et al., 2005). A grelha de acoplamento de 20 Å foi posicionada no local ativo da TIM, tendo o Glu104 como centro. Para orientar a experiência de acoplamento molecular, foram utilizados os seguintes parâmetros: execuções - 10; iterações máximas - 3.000; tamanho da população - 100; taxa de cruzamento - 0,9; e fator de escala - 0,5. Todas as poses obtidas foram classificadas de acordo com a pontuação do programa Autodock. Para validar o protocolo de acoplamento, foram efetuadas simulações de reacoplamento com todos os compostos com o PatchDock Server (Laskowski et al., 2018). Os valores de Root Mean Square Deviation (RMSD) inferiores ou iguais a 1,0 Å foram considerados satisfatórios para replicar o modo de ligação do sítio na estrutura cristalográfica quando comparado com inibidores do sítio ativo. Finalmente, as interações entre os sítios e as estruturas *li*TIM e *lb*TIM foram

analisadas utilizando o servidor PDBSUM (Laskowski et al., 2018). Após análise e validação, o complexo de pose mais bem previsto obtido a partir do AutoDock Vina foi utilizado como ponto de partida para as simulações DM.

4.14.2 Simulações de docagem molecular (DM)

Utilizando o pacote Amber18 (Case et al., 2005b), as simulações DM foram efetuadas para os seguintes sistemas *lb*TIM e *ll*TIM: três sistemas para cada composto posicionado na interface entre as subunidades e outros três sistemas para cada composto posicionado no sítio catalítico. Em primeiro lugar, as cargas atômicas parciais dos sítios foram determinadas utilizando o protocolo Restrained Electrostatic Potential através de cálculos quânticos no programa Gaussian09 e a carga molecular calculada por ponto único utilizando o método Hartree-Fock com o conjunto de bases 6-31G*. Os sistemas TIM da leishmania foram solvatados no programa tLeap utilizando uma caixa de água octaédrica truncada com o modelo de solvatação explícito TIP3P (Mark & Nilsson, 2001). A distância entre a parede da caixa de água e os átomos do sistema solvatado foi fixada em 12 Å. Foram adicionados contra íons (Cl⁻) à caixa de água para manter a eletroneutralidade. Os campos de força Amberff99SB e General Amber Force Field foram utilizados para parametrizar a estrutura *lb*TIM e os sítios, respetivamente. Um protocolo de minimização de energia com nove passos que incluiu o algoritmo de descida mais íngreme e de gradiente conjugado foi efetuado para todos os sistemas. Todos os átomos de hidrogénio foram minimizados em 6.000 ciclos (3.000 ciclos do algoritmo de descida mais acentuada e 3.000 do algoritmo de gradiente conjugado). A água e os íons foram minimizados em 12.000 ciclos (2.000 ciclos do algoritmo steepest-descent e 10.000 ciclos do gradiente conjugado). Finalmente, todo o sistema TIM foi minimizado por sete etapas de 20.000 ciclos (10.000 do algoritmo de descida mais acentuada e 10.000 gradiente conjugado), com a diminuição progressiva das restrições. Após a conclusão da minimização, os sistemas foram aquecidos através de 5 ns de simulação DM para aumentar a temperatura para 300K e atingir o equilíbrio. Em seguida, 10 ns de simulação DM foram realizados no conjunto isobárico-isotérmico. As temperaturas do sistema foram mantidas com o termostato de Langevin, e o algoritmo Shake foi usado para manter todas as ligações H em suas distâncias de equilíbrio pré-definidas obtidas durante a minimização (Mark & Nilsson, 2001; Roux et al., 1996), o que permitiu ciclos de

integração de 2 fs. Foi utilizado um corte de 10 Å para a convenção de imagem mínima.

4.14.3 Cálculos de energia livre de ligação

De cada trajetória DM dos sistemas TIM, os últimos 1 ns, que representam 1000 quadros, foram utilizados para calcular a energia livre de ligação entre os ligantes e os resíduos do sítio ativo da TIM utilizando o método Mecânica Molecular com Poisson-Boltzmann e solvatação de área de superfície (MM-PBSA), ambos disponíveis no pacote Amber18 (Case et al., 2005c).

5. Resultados e Discussão (Etapa 1)

5.1 Caracterização química da FDCM

A caracterização química completa da FDCM e a quantificação das brachydinas presentes na fração (Figura 8) são descritas em trabalhos anteriores realizados pelo nosso grupo de pesquisa (da Rocha et al., 2014; Salgado et al., 2020).

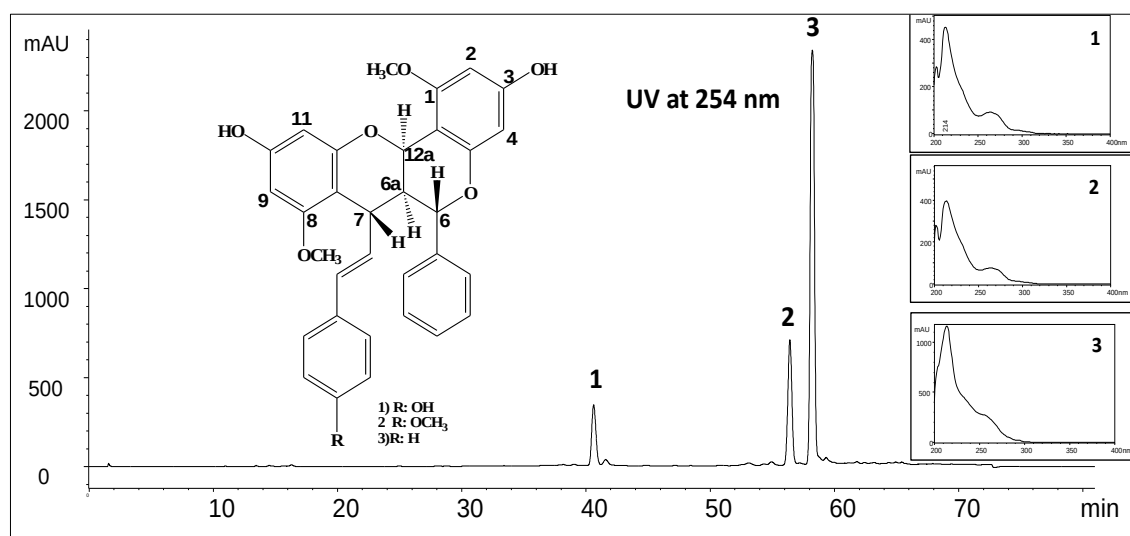


Figura 8. Estrutura química dos principais compostos, brachydina A (1), brachydina B (2) e brachydina C (3), por cromatograma HPLC-PDA e espectro UV dos compostos 1-3 da FDCM (fração diclorometano).

Para confirmar a presença das brachydinas na FDCM, foi realizada análise por LC-MS e comparada com os padrões autênticos de brachydinas isoladas pelo nosso grupo (Figura 9).

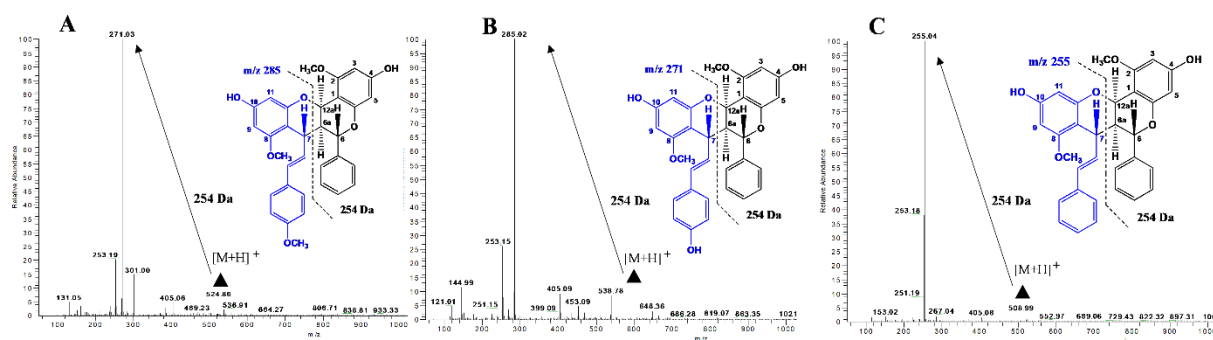


Figura 9. Fragmentos observados na análise HPLC-ESI-MS/MS da FDCM de *F. platyphylla* e fragmentação característica das brachydinas A, B e C. Os dados de espectrometria de massa foram comparados com os dados de Rocha et al., 2014.

5.2 FDCM apresenta atividade antileishmanial

A tabela 7 apresenta os resultados da atividade da FDCM contra as espécies de *Leishmania*. A atividade antiparasitária foi detectada de maneira dependente da concentração contra *L. infantum* ($IC_{50} = 10,13 \mu\text{g/mL}$), *L. braziliensis* ($IC_{50} = 11,44 \mu\text{g/mL}$) e *L. mexicana* ($IC_{50} = 11,16 \mu\text{g/mL}$) formas promastigotas. Curiosamente, o IC_{50} da FDCM foi significativamente menor do que o IC_{50} do antimônio trivalente (Sb^{III}) para todas as espécies de *Leishmania*. Resultados semelhantes foram encontrados quando a FDCM foi testada contra formas amastigotas ($IC_{50} = 4,81 \mu\text{g/mL}$ para FDCM; $IC_{50} = 5,89 \mu\text{g/mL}$ para MA; e $IC_{50} = 0,16 \mu\text{g/mL}$ para AMB).

Tabela 7. Concentração inibitória detectada em *Leishmania spp* e macrófagos tratados com a fração diclorometano, anfotericina B, antimoníato de meglumina e antimoníato trivalente (Sb^{III}).

Composto	IC_{50} ($\mu\text{g/mL}$) Promastigota			IC_{50} ($\mu\text{g/mL}$) Amastigota		
	<i>L.infantum</i>	<i>L.braziliensis</i>	<i>L.mexicana</i>	CC ₅₀ MΦ	<i>L.infantum</i>	IS
FDCM	10,13±0,54	11,44±0,70.	11,16±0,56	25,15±1,58	4,81±0,73	5,2
AMB	2,93±0,29	2,44±0,29	2,87±0,27	6,64±0,49	0,16±0,03	41,5
MA	-	-	-	2,13±0,45	5,89±2,20	0,36
Sb^{III}	33,58±4,07	34,77±4,87	48,19±4,92	-	-	-

FDCM: fração diclorometano; AMB: anfotericina B; MA: antimoníato de meglumina; Sb^{III} : antimônio trivalente; MΦ: macrófagos; CC₅₀: concentração citotóxica para 50% dos macrófagos; IC_{50} : concentração inibitória para 50% dos parasitas; IS: índice de seletividade (CC₅₀/ IC_{50}).

O antimoníato de meglumina foi o composto mais tóxico ($IC_{50} > 50,0$). Os tratamentos com esse fármaco só são eficazes quando administrados de forma contínua e adequada, sendo que a falha terapêutica e o surgimento de formas resistentes ocorrem com doses baixas e em tratamentos descontinuados (Carvalho et al., 2020). Além disso, podem também ocorrer vários efeitos colaterais, como dores musculares e esqueléticas, náuseas, vômitos, diarreia, dor abdominal, cefaleia,

anorexia, astenia, febre, fadiga, exantema, eritema e urticária, hepatotoxicidade e dor no local de aplicação do medicamento (Wyrepkowski et al., 2020). Os efeitos colaterais relacionados à anfotericina B compreendem febres, calafrios, hipotensão ou hipertensão, toxicidade renal, hematológica e hepática (Morizot et al., 2016; Pradhan et al., 2022). O anfotericina B apresentou o menor IC₅₀ tanto para a forma promastigota quanto para a forma amastigota. Vale ressaltar que, além da eficácia e segurança, os custos de uma determinada intervenção em saúde também deve ser considerados. Nesse sentido, a anfotericina B apresenta os maiores custos (Carvalho et al., 2021; Mistro et al., 2017), restringindo o acesso à terapia, principalmente nos países endêmicos mais pobres. Além disso, os custos do tratamento da leishmaniose englobam o monitoramento da toxicidade do tratamento, a internação para administração do medicamento e os profissionais especializados.

A concentração citotóxica da FDCM foi a maior para macrófagos (CC₅₀ = 25,15 µg/mL) (Tabela 7), enquanto a AMB apresentou o maior valor do índice de seletividade (IS = 41,5), seguido da FDCM (IS = 5,2) e MA (IS = 0,36).

Pereira e colaboradores (2012) investigaram a atividade antileishmanial das frações hexânica, acetato de etila, butanólica e aquosa obtidas de um extrato hidroetanólico isolado do caule, raízes e folhas de *F. platyphylla*. Os resultados indicam que a fração acetato de etila (IS = 10,75) obtida das folhas é mais ativa contra *L. amazonensis*, inibindo promastigotas e amastigotas em 3,94±0,13µg/mL e 14,1±0,08 µg/mL, respectivamente, com uma concentração citotóxica de 151,62 µg/mL observada em macrófagos peritoneais murinos. Os dados promissores apresentados pela fração acetato de etila obtida das folhas de *F. platyphylla* corroboram com a hipótese de que frações obtidas com solventes de média polaridade pode ser muito ativas devido à presença de compostos não glicosilados, como é o caso da FDCM obtida das raízes de *F. platyphylla*, que é rico em brachydinas não glicosiladas. As agliconas das brachydinas desempenham provavelmente um papel fundamental no aumento da lipofilicidade, aumentando consequentemente a penetração da fração através das membranas celulares dos protozoários, e pensa-se também que inibem a atividade das enzimas envolvidas na via glicolítica do parasita. Esta inibição é fundamental para evitar que o parasita evite ou resista à resposta imune inata, que é crítica para a manutenção da infecção.

5.3 FDCM não induz dano *in vitro* no DNA em concentrações baixas

As frequências das classes de nucleóides em células RAW 264.7 não infectadas foram determinadas pelo ensaio cometa. As concentrações de FDCM foram baseadas no teste de citotoxicidade previamente efetuado (40 µg/mL, 25 µg/mL e 10 µg/mL), correspondendo a 10, 50 e 90% de viabilidade celular, respetivamente. Apenas a concentração mais alta da FDCM (40 µg/mL) induziu danos no DNA, em ambos os tempos de exposição (3 e 24 horas) (Figura 10), cerca de 4 vezes superior ao IC₅₀ determinado para todas as espécies de *Leishmania* e 1,6 vezes superior ao CC₅₀ determinado para macrófagos (Tabela 6). Embora a FDCM tenha induzido danos no DNA em concentrações elevadas (40 µg/mL), não foram observados efeitos genotóxicos significativos em concentrações mais baixas (25 µg/mL e 10 µg/mL), sugerindo um perfil de segurança dependente da dose. Nossos dados corroboram com dados da literatura que relatam a capacidade da brachydina em induzir danos ao DNA em diferentes células (Resende et al., 2017; Nunes et al., 2020; Maciel-Silva et al., 2022). Curiosamente, Maciel-Silva et al (2022) também descreveram alterações ultra estruturais em células de membrana expostas a FDCM, semelhantes às observadas aqui em macrófagos infectados com *L. infantum* tratadas com FDCM.

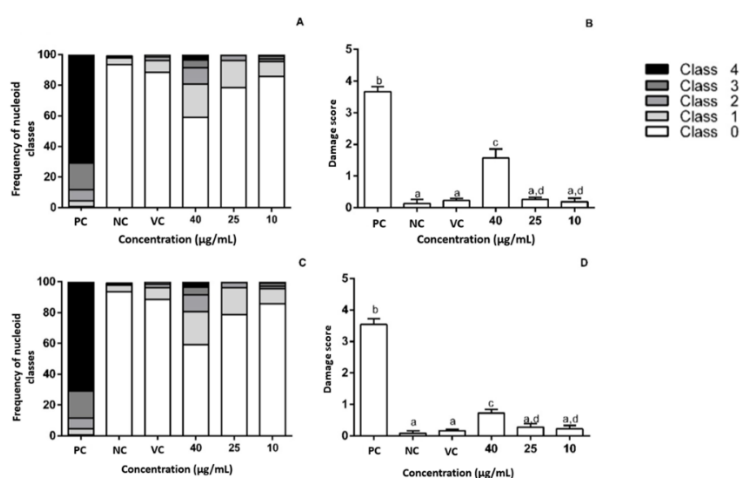


Figura 10. Frequências das classes de nucleóides e seus respectivos escores de danos detectados após 3 horas (A e B, respetivamente) e 24 horas (C e D, respetivamente) pelo ensaio Cometa realizado em macrófagos da cepa RAW 264.7 tratados com a FDCM a 40µg/mL, 25µg/mL e 10 µg/mL. CN: controle negativo (meio de cultura RPMI 1640). CP: controle positivo (H₂O₂). CV: controle do veículo (macrófagos expostos a 0,5% de DMSO).

Assim, em contraste com outros fármacos antileishmaniais, que têm sido relatados como genotóxicos (Lima et al., 2010; Moreira et al., 2017; Castelo-Branco et al., 2016; Egito et al., 2004), as brachyginas podem atuar perturbando as

membranas celulares em vez de danificar o DNA, sugerindo que os ensaios pré-clínicos *in vivo* podem ser úteis.

5.4 FDCM reduz a capacidade da *L. infantum* de invadir macrófagos

A FDCM investigada diminuiu, de forma dependente da dose, o número de macrófagos infectados com promastigotas de *L. infantum* ($p < 0,001$). As duas concentrações mais altas (39,2 µg/mL e 19,6 µg/mL) reduziram o número de células infectadas em 49% e 44%, respectivamente, e a quantidade de amastigotas internalizadas em 47% e 40%, respectivamente (Figura 11). Interessantemente, da Rocha et al. (2014) demonstraram que a FDCM foi mais eficaz que o benzonidazol na redução da quantidade de *T. cruzi* intracelular em macrófagos de camundongos BALB/c em 92%.

Vale ressaltar que o antimoniato de meglumina diminuiu o número de células infectadas em 56,6% e 50% nas concentrações de 138,4 µg/mL e 69,2 µg/mL, respectivamente, comparáveis aos resultados obtidos com uma concentração menor da FDCM (39,2 µg/mL). Por outro lado, a anfotericina B foi mais eficaz na redução do número de células infectadas, em 71,4% e 60,3% a 8 µg/mL e 4 µg/mL, respectivamente, corroborando com Mello et al (2014).

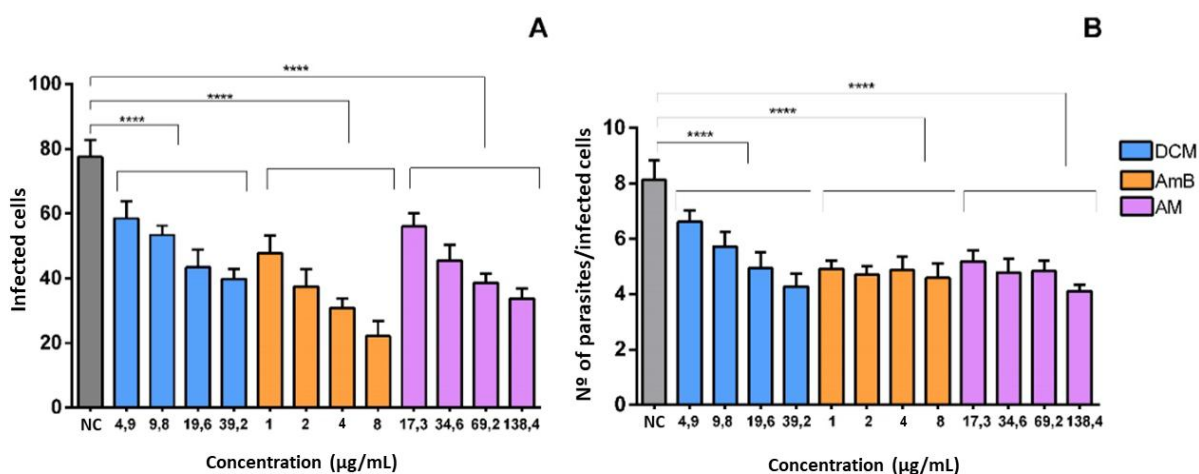


Figura 11. Número de macrófagos (RAW 264.7) infectados com promastigotas de *L. infantum* durante 4 horas (A) e número de amastigotas internalizados após 24 horas (B) de tratamento com FDCM (DCM), Anfotericina B (AmB) e Antimoniato de Meglumina (AM).

5.5 FDCM inibe a multiplicação de *L. infantum* em macrófagos.

Considerando a redução substancial do número de parasitas observada no ensaio de invasão, também foram realizados ensaios de multiplicação, nos quais os macrófagos infectados foram tratados com as mesmas concentrações da FDCM, mas

por diferentes períodos (24 h, 48 h, 72 h e 96 h). Os resultados indicam que a FDCM foi capaz de reduzir a multiplicação do parasita nos macrófagos ($p < 0,0001$) de uma forma dependente da concentração, significativamente maior nas duas concentrações mais altas (Figura 12A), embora não tenham sido observadas diferenças entre os tempos de tratamento. Ambos os medicamentos antileishmaniais conhecidos também inibiram a replicação do parasita em todas as concentrações testadas e durações de tratamento (Figuras 12B e 12C).

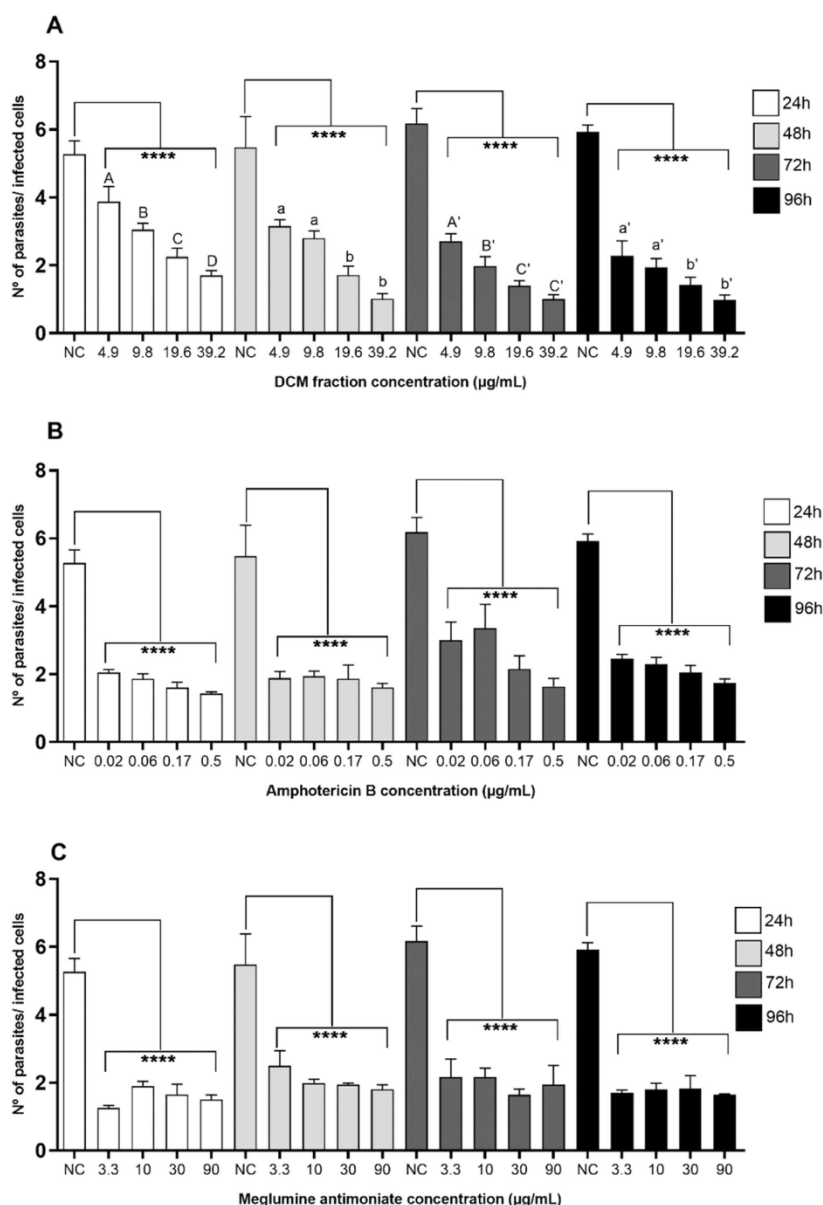


Figura 12. Número de formas amastigotas internalizadas em macrófagos (RAW 264.7) infectados com *L. infantum* e tratados com A) fração DCM, B) anfotericina B e C) antimoniato de meglumina em diferentes concentrações e horas.

5.6 Resultados de Docagem Molecular (DM)

A triose-fosfato isomerase (TIM) é uma enzima, presente em quase todos os organismos, que catalisa a conversão do fosfato de dihidroxiacetona (DHAP) em gliceraldeído-3-fosfato (G3P) na via glicolítica (Myers & Palladino, 2023). A sua inibição pode perturbar a via glicolítica, levando à depleção de ATP e, em última análise, à morte dos protozoários (Saramago, et al., 2018; Juárez-Saldivar, et al., 2021). É importante notar que a enzima TIM tem a particularidade de apresentar taxas catalíticas elevadas apenas na sua forma dimérica (Zomosa-Signoret et al., 2003).

Estudos computacionais da literatura demonstraram que flavonoides e outros produtos naturais podem inibir a atividade do TIM da *Leishmania* e, por conseguinte, podem constituir potenciais inibidores do crescimento desse gênero de parasitas (Juárez-Saldivar, et al., 2021; Vázquez-Jiménez, et al., 2022; Malak et al., 2023; González-Morales et al., 2023). Além disso, a estrutura dimérica das brachydinas pode aumentar potencialmente a sua atividade inibitória contra o TIM da *Leishmania* em comparação com os flavonoides monoméricos, como a luteolina e a quercetina (Wong, et al., 2012; Rocha, et al., 2019). Este fato fornece uma justificativa para investigar os potenciais efeitos inibitórios da FDCM na TIM. No entanto, é importante notar que, embora a TIM seja um alvo promissor, os parasitas também podem ter vulnerabilidades adicionais, e pode ser necessária uma abordagem multialvo para um controle eficaz dos parasitas. Embora existam provas de que os flavonoides reduzem a expressão da TIM *in vivo* (Su et al., 2014), o efeito dos flavonoides na eficácia da inibição das enzimas TIM continua a ser uma área de investigação pouco explorada.

Nossos resultados de docagem indicaram duas possibilidades principais para a ligação molecular dos compostos de brachydina A (1), B (2) e C (3) na *L. infantum* TIM (*l*iTIM) (Figura 13 e 14). A primeira região potencialmente envolvida na ligação da brachydina está localizada na interface entre as subunidades A e B do homodímero. As cadeias laterais de Arg99 e Asp116 estão envolvidas nas interações de ligação de hidrogénio com os átomos O6 e O5 dos compostos e os resíduos Tyr102, Tyr103, Phe75 e Glu98 estabilizam os contatos no anel D do inibidor (Figura 13). Além disso, os anéis hidrofóbicos Tyr103 das subunidades A e B formam uma interação de empilhamento com as brachydinas investigadas. Além disso, o composto 1 também é estabilizado pelos resíduos Ala70, Lys113, Lys71, Glu98 e Glu105. O Glu105, que ocorre em conformações alternativas em muitas estruturas TIM com uma interface não ligada, adota seletivamente uma das conformações, facilitando a ligação do

ligante na interface (Gayathri et al., 2009). O bolsão de ligação ocorre na porção exterior da interface (Figura 13).

Estes resultados estão de acordo com estudos anteriores que demonstram a eficácia de atingir a interface do dímero TIM do *T. cruzi* com pequenas moléculas para matar seletivamente o parasita (Olivares-Illana, et al., 2007; Téllez-Valencia, et al., 2004). Estas observações corroboram com a conclusão teórica de que a ligação da brachydina à interface do dímero poderia induzir alterações conformacionais do dímero e sugerem que a seleção da interface do dímero de enzimas oligoméricas com flavonoides poderia ser uma estratégia viável para a descoberta de medicamentos.

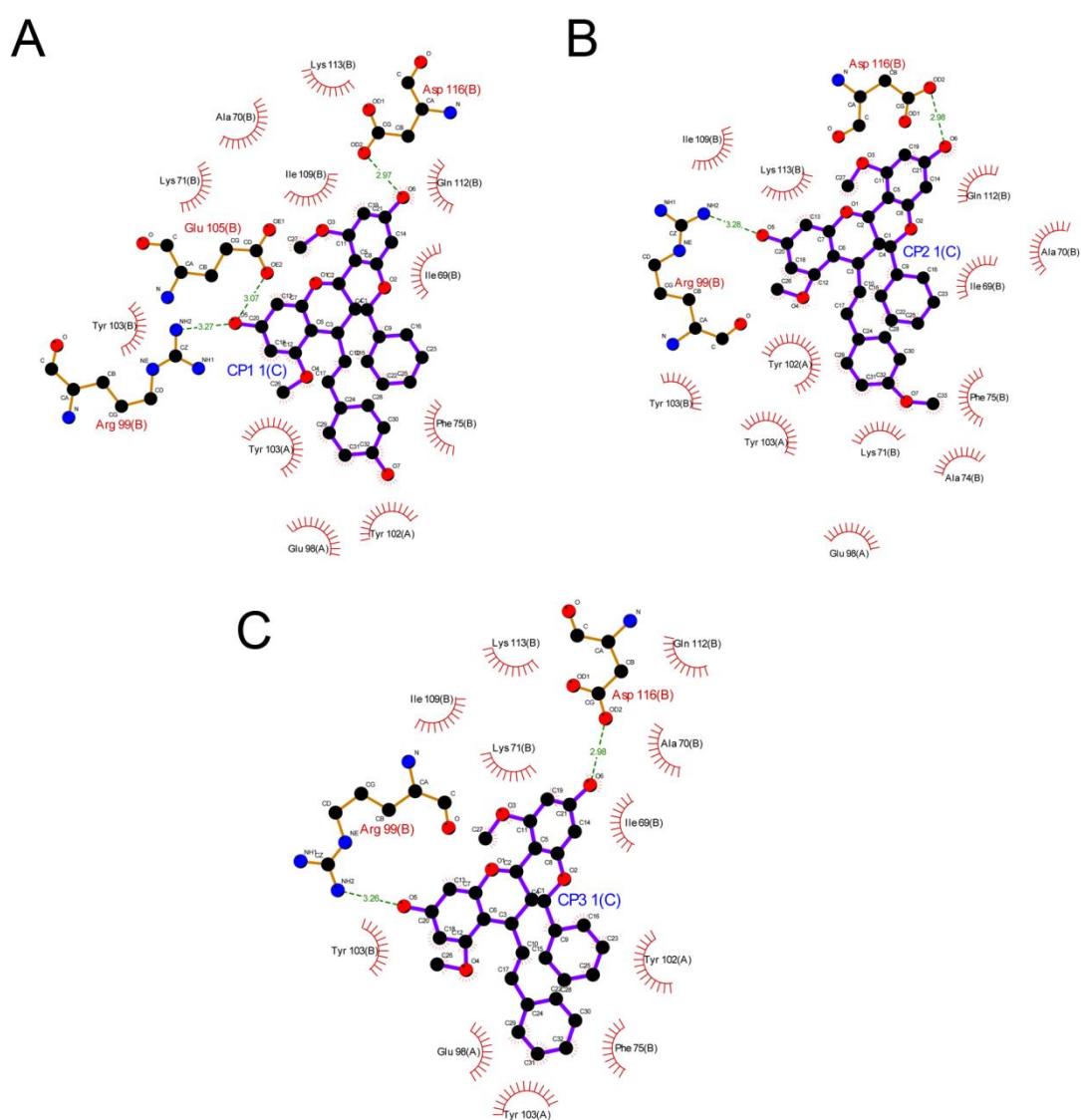


Figura 13. Principais interações das brachydinas ancoradas na interface homodimérica do *ITIM*. A) Brachydina 1 B) Brachydina 2 C) Brachydina 3

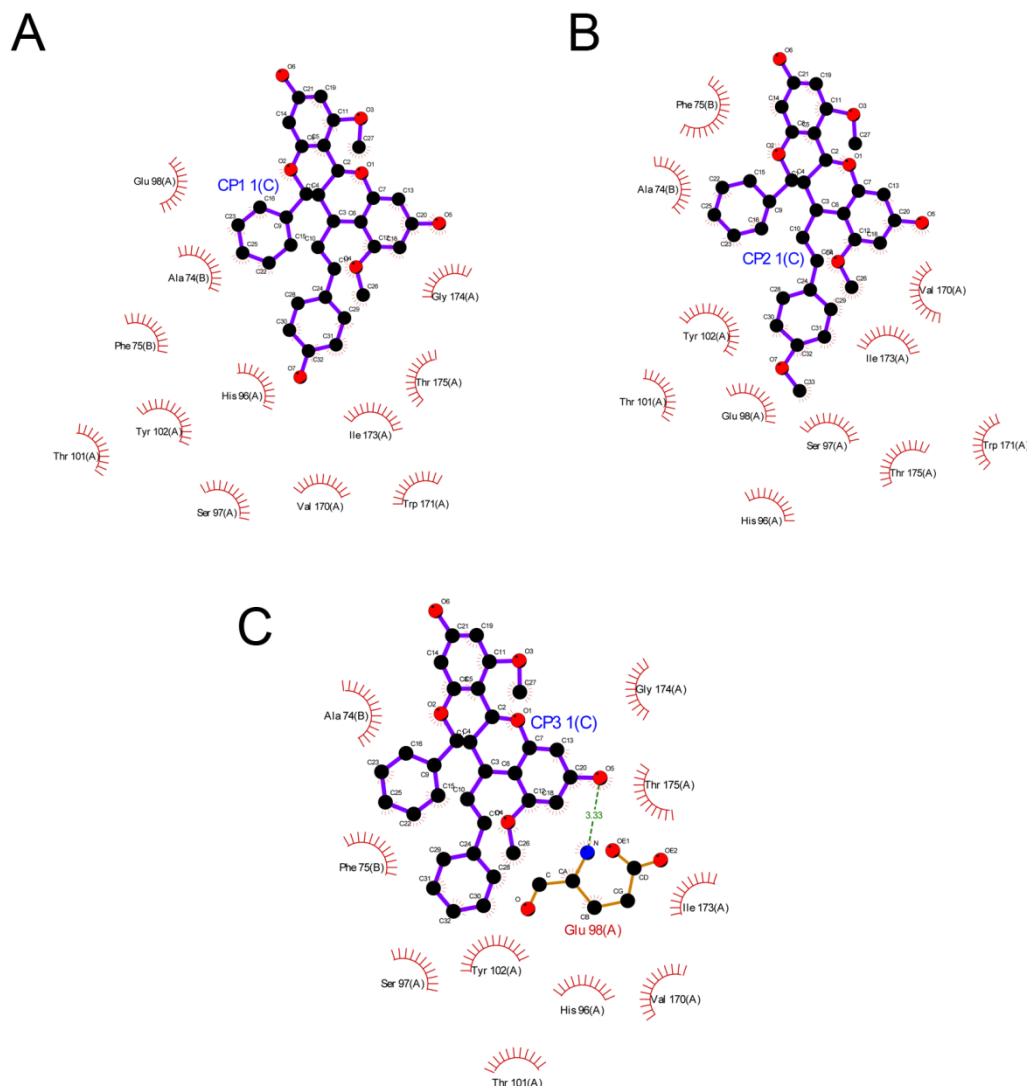


Figura 14. Principais interações das brachydinas ancoradas no sítio catalítico do *l*TIM. A) Brachydina 1 B) Brachydina 2 C) Brachydina 3

A segunda região de ligação possível envolve o Loop-6 flexível (resíduos 168-180) e o Loop-7 (resíduos 212-216), uma região que se fecha na ligação ao substrato (Figura 14) (Casteleijn et al., 2006). O glutamato catalítico Glu98 está localizado no início do Loop-6, compreendendo a base catalítica do *l*TIM, que abstrai o próton do substrato, gerando o intermediário enediolato (Figura 14). Foram observados resultados semelhantes para o *l*bTIM (Figura 15 e 16). Estes resultados corroboram estudos anteriores, como a descrição da estrutura cristalina de TIM obtida de *Entamoeba histolytica*, que revelou uma região flexível de Loop-6 que se fecha após a ligação do substrato e é observada em vários organismos (Rodríguez-Romero, et al., 2002; Liao, et al., 2018; Katebi, & Jernigan, 2014). Assim, os resultados da docagem indicam dois potenciais locais de ligação para as brachydinas envolvidas na

estabilização da interface do dímero no local catalítico do TIM. O estudo destas interações poderá resultar na proposta de novos e mais sítios ativos que inibam a *l*/TIM.

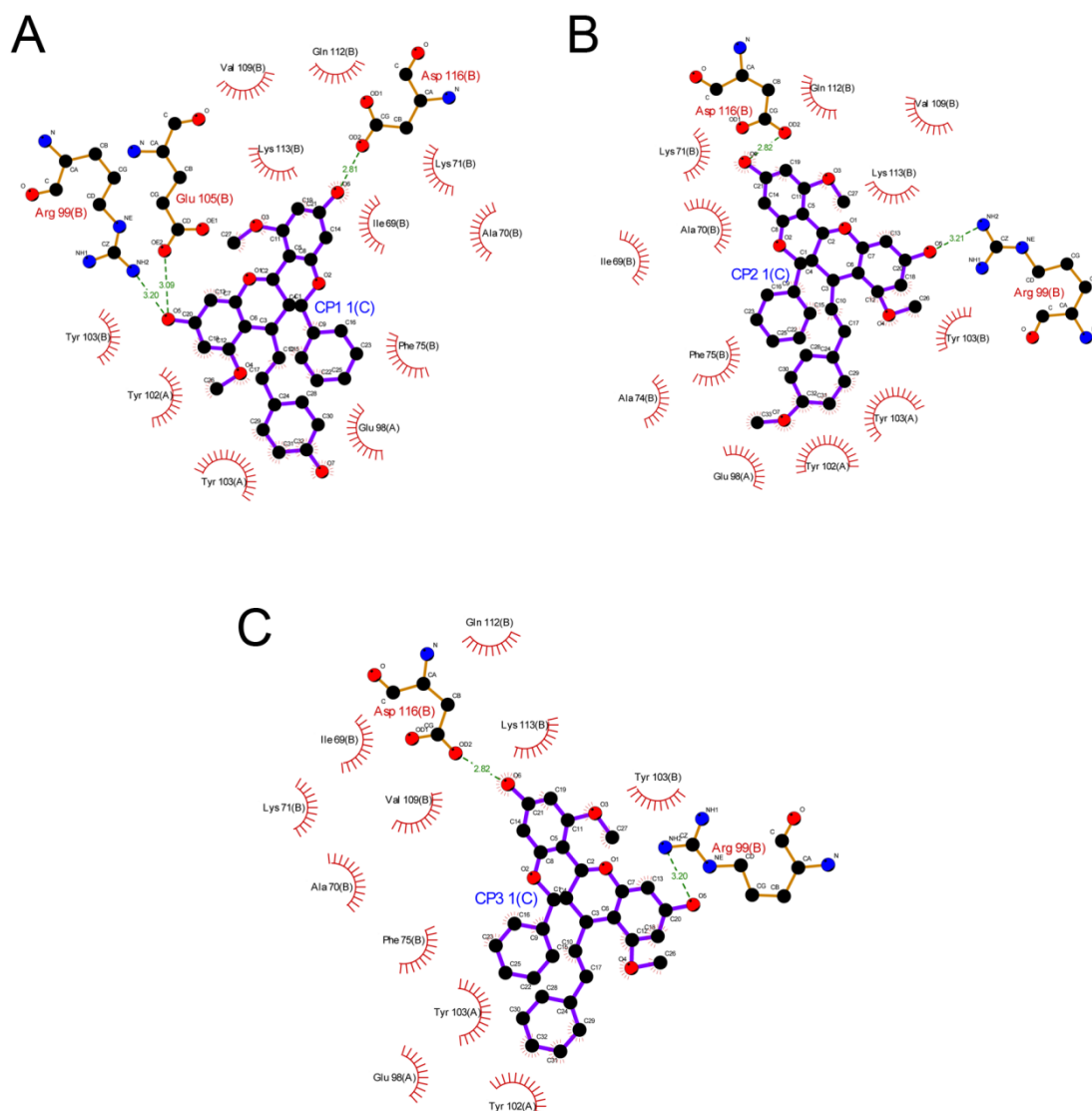


Figura 15. Principais interações das bradykinas ancoradas na interface homodimérica do *l*/TIM. A) Brachydina 1 B) Brachydina 2 C) Brachydina 3

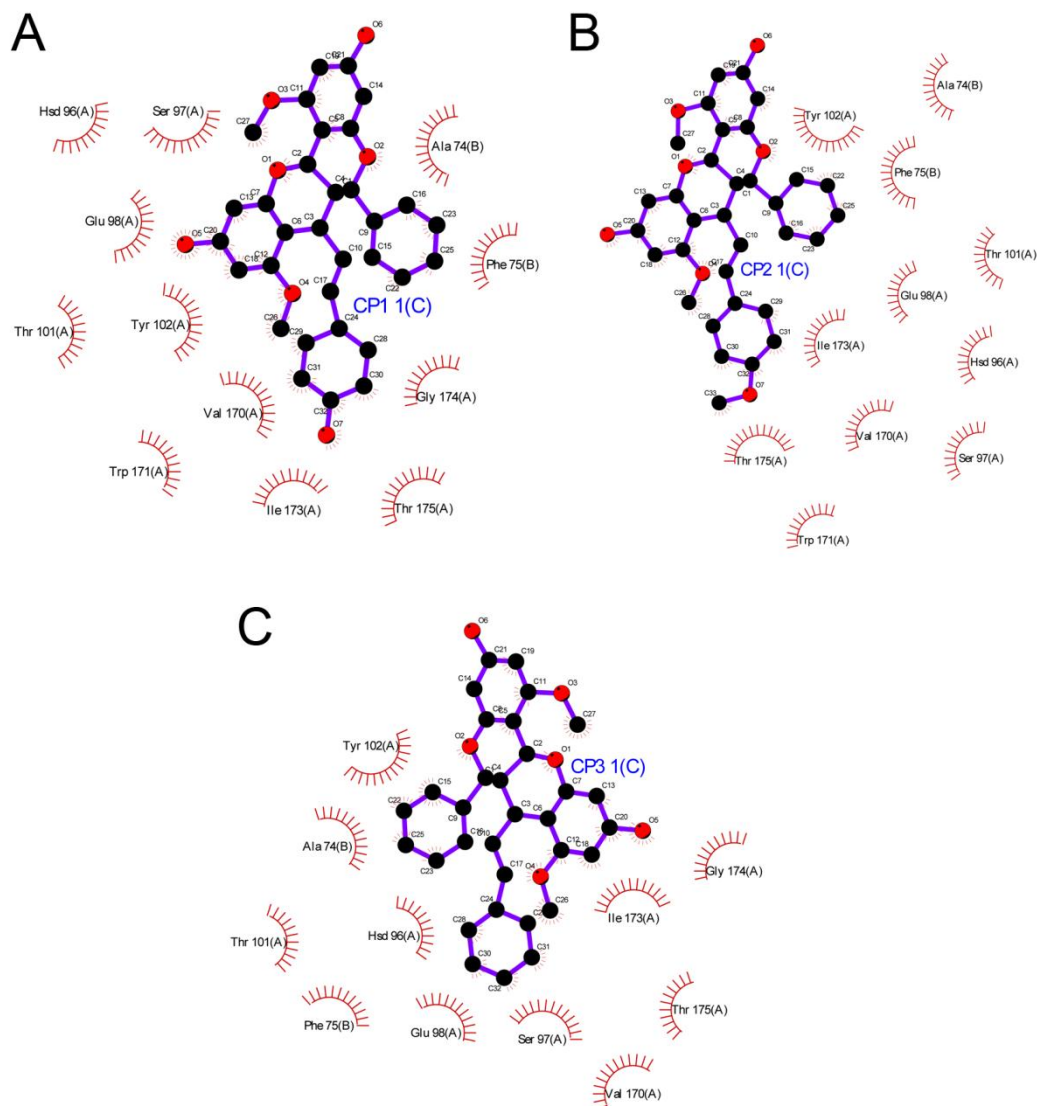


Figura 16. Principais interações das bradydinas acopladas ao sítio catalítico do *lbTIM*. A) Brachydina 1 B) Brachydina 2 C) Brachydina 3

5.6.1 Resultados de simulação de DM

Com base nas estruturas obtidas no estudo de acoplamento, foram efetuadas simulações DM de 10ns para os três compostos nas duas posições, a fim de avaliar melhor as interações entre os compostos investigados em diferentes locais de ligação.

A estrutura *lbTIM* complexada com os compostos 1, 2 e 3 na interface do dímero indicou valores médios de RMSD de $1,4 \pm 0,1$ Å, $1,2 \pm 0,1$ Å e $1,4 \pm 0,4$ Å, respetivamente. No local catalítico, foram observados valores de RMSD de $1,6 \pm 0,3$ Å, $1,8 \pm 0,3$ Å e $1,6 \pm 0,3$ Å para os compostos 1, 2 e 3, respetivamente (Figura 17 e Tabela 8). No geral, os compostos de brachydina investigados exibiram melhor estabilização na interface do dímero, especialmente o composto 2, que apresentou

melhor estabilidade ao longo do tempo nesta posição. É interessante notar que um estudo *in vitro* anterior sobre estes compostos demonstrou que o Composto 2 da brachydina exibe a capacidade de induzir lesões celulares que progrediram para a morte do parasita de *Leishmania* (Rocha et al., 2019).

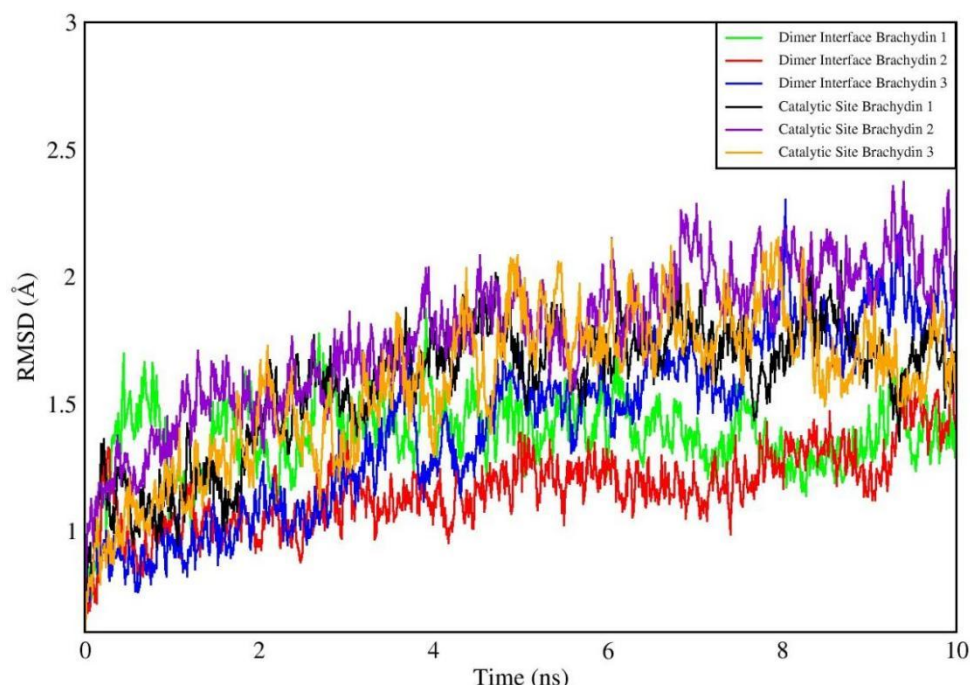


Figura 17. Gráficos RMSD dos complexos de compostos de brachydina analisados com //TIM calculados nos átomos pesados da espinha dorsal da proteína (C α , N e O) durante 10ns de simulação DM.

Tabela 8. Valores médios de RMSD para complexos de compostos de brachydina com //TIM em simulações DM de 10 ns (Å).

//TIM-Brachydina 1		//TIM-Brachydina 2		//TIM-Brachydina 3	
Interface do dímero	Sítio Catalítico	Interface do dímero	Sítio Catalítico	Interface do dímero	Sítio Catalítico
1,4 $\pm$ 0,1	1,6 $\pm$ 0,3	1,2 $\pm$ 0,1	1,8 $\pm$ 0,3	1,4 $\pm$ 0,4	1,6 $\pm$ 0,3

^a Os valores entre parênteses representam o maior desvio atômico observado

Após 10ns de simulações DM, o composto 3 desestabilizou-se ao longo do tempo na interface do dímero, apresentando perda de ligações de hidrogénio e interações hidrofóbicas (Figura 18). Em contraste, os compostos 1 e 2 exibiram uma acomodação na interface, não só mantendo uma ligação de hidrogénio muito estável com Asp116, mas ganhando mais duas com a cadeia lateral do resíduo Asn67 e outras interações com Glu78, Thr76, Phe75 e Ala70. A figura 19 mostra os modos de ligação do //TIM quando complexado com brachydina 2 e as interações moleculares obtidas por simulações de DM.

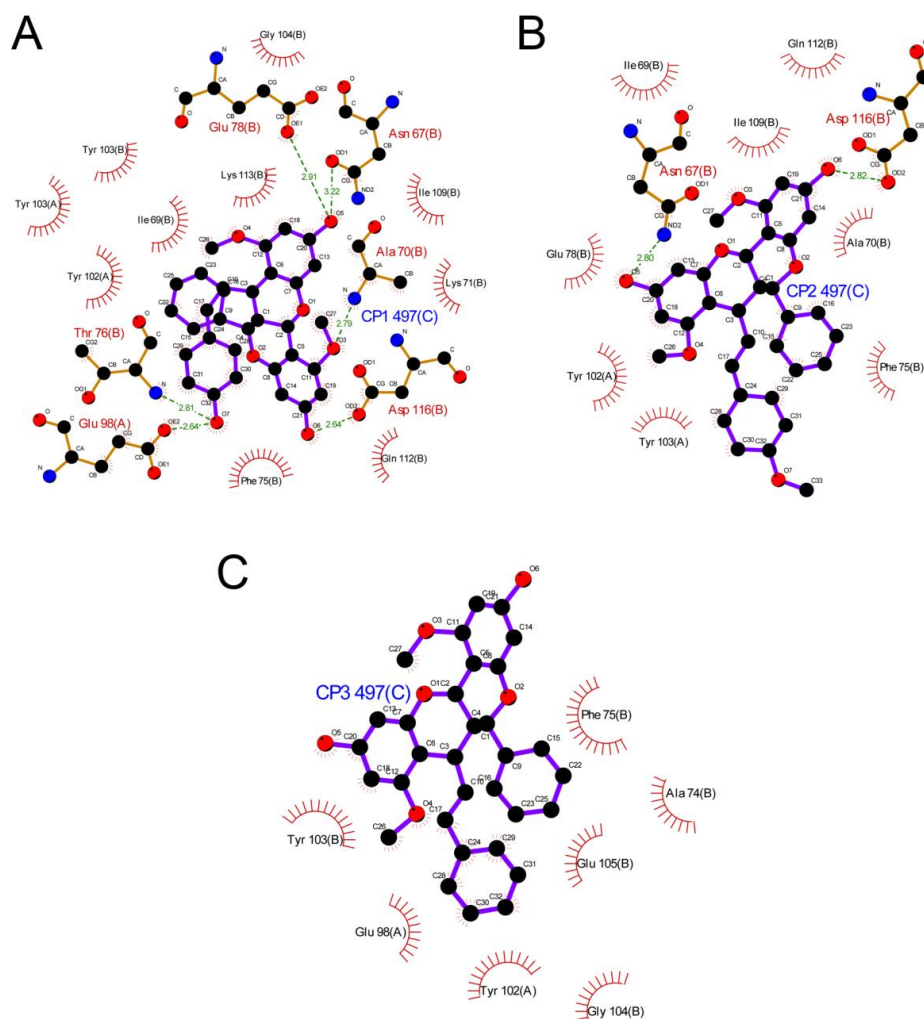


Figura 18. Principais interações das brachydinas na interface homodimérica do *i*TIM após 10ns de simulação DM. A) Brachydina 1 B) Brachydina 2 C) Brachydina 3

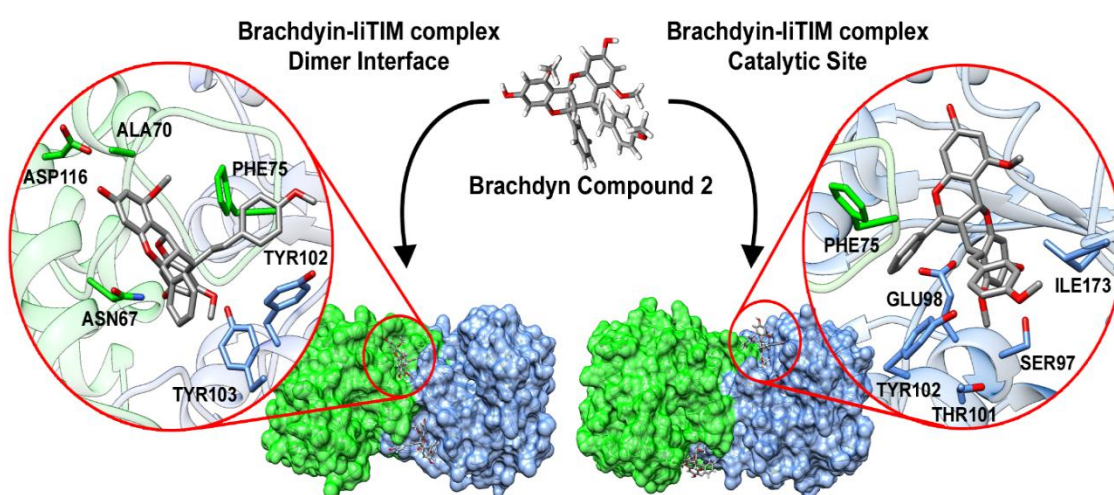


Figura 19. Mapa de superfície da proteína, onde a região realçada indica a cavidade de ligação da brachydina na A) interface do dímero. B) sítio catalítico. Subsítio A da *i*TIM em azul; Subsítio B da *i*TIM em verde. Os hidrogénios foram ocultos para uma melhor visualização.

Os resultados de docagem relativos aos compostos localizados perto do sítio catalítico indicam a mesma desestabilização da interação inicial para o Composto 1. O Composto 3 mostrou acomodação com Tyr102 e Lys14, formando interações de ligação de hidrogénio com o átomo O5 e Lys71, Ala74, Glu98, Ile173 e Gly174, também estabilizando o complexo (Figura 20).

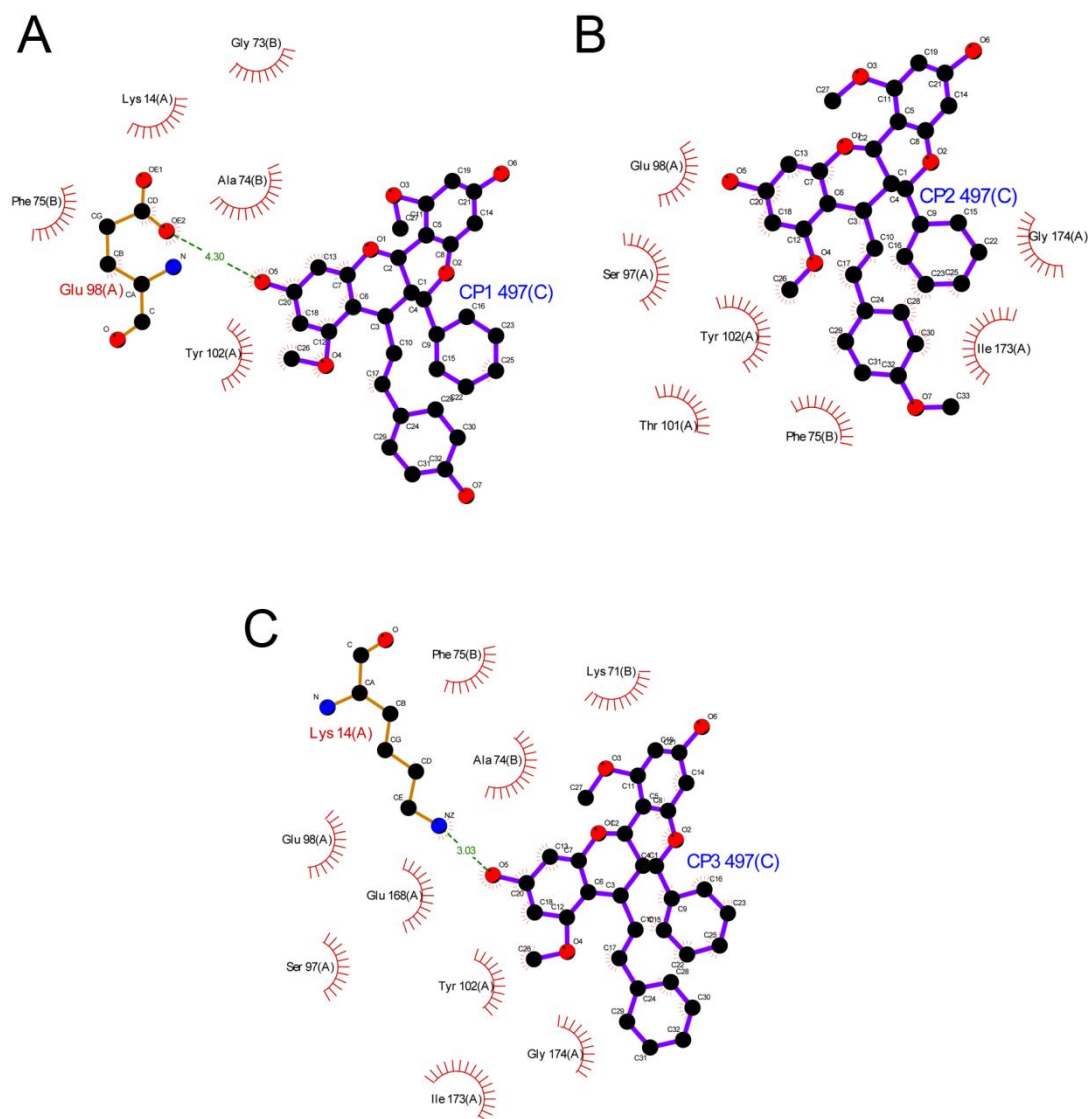


Figura 20. Principais interações das brachydinas no sítio catalítico do *l*/TIM após 10ns de simulação DM. A) Brachydina 1 B) Brachydina 2 C) Brachydina 3

As energias livres de ligação (ΔG) dos compostos naturais e dos inibidores cristalográficos foram estimadas através do método MM-GBSA (Tabela 9). Os cálculos de energia indicaram que, embora as brachydinas apresentem afinidades semelhantes em ambos os locais de ligação, têm maior afinidade para a interface do dímero *l*/TIM (Tabela 8). Isto pode explicar a desestabilização da interação observada durante as simulações de DM, quando comparada com os resultados de

acoplamento. É importante notar que são necessários mais estudos computacionais e experimentais para avaliar melhor as interações e afinidades da brachydina com o *l*/TIM. Os resultados computacionais do *l*bTIM também foram efetuados e são apresentados na Tabela 10.

Tabela 9. Energias livres de ligação dos compostos de brachydina

Composto	ΔG_{GBSA} (kcal.mol ⁻¹)	
	Interface do dímero	Sítio ativo
Brachydina A (1)	-36,4 ± 3,4	-13,9 ± 2,4
Brachydina B (2)	-37,9 ± 2,7	-14,5 ± 3,7
Brachydina C (3)	-27,8 ± 2,0	-7,5 ± 1,7

Tabela 10. Energias livres de ligação dos compostos de brachydinas em complexo com *l*bTIM

Sistema	ΔG_{PBSA} (kcal.mol ⁻¹)	
	Interface do dímero	Sítio Catalítico
complexo <i>l</i> bTIM-Brachydina 1	-95,4 ± 2,1	-86,3 ± 5,2
complexo <i>l</i> bTIM-Brachydina 2	-121,6 ± 2,2	-118,7 ± 4,6
complexo <i>l</i> bTIM-Brachydina 3	-98,1 ± 6,4	-91,0 ± 6,2

O composto 3 demonstrou ser um candidato inadequado para a atividade leishmanicida, devido aos seus valores RMSD mais elevados e às interações mais fracas na interface do dímero e no local catalítico do *l*/TIM ao longo do tempo de simulação, o que indica um composto menos estável, resultando numa menor eficácia. Os compostos 1 e 2, por outro lado, demonstraram uma combinação intrigante semelhante de interação estável na interface do dímero e no local catalítico. A brachydina B demonstrou maior estabilidade a longo prazo em ambas as posições, o que pode ser atribuído à sua capacidade de induzir lesões celulares que levam à morte da *Leishmania* (Rocha et al., 2019). Os resultados do MMGBSA também indicam que a brachydina B exibe energias de ligação mais altas do que a brachydina C, apoiando seu potencial como um melhor candidato antileishmanial. Os resultados encontrados para a FDCM, na presente investigação, mostram que a fração é tão eficiente como a brachydina B, isolada. Esta é uma descoberta muito importante, porque o isolamento do composto depende de várias etapas e tem um custo muito elevado, enquanto a obtenção da FDCM é um processo mais simples e de baixo custo.

Em pesquisas futuras, um exame mais amplo de alvos potenciais dentro dos parasitas, juntamente com uma investigação minuciosa da FDCM com esses alvos, será crucial para uma compreensão mais abrangente do mecanismo de ação dos produtos naturais e do seu potencial como agente antiparasitário. Além disso, estudos adicionais podem elucidar se os compostos 1, 2 e 3 têm seletividade para TIM em comparação com outros alvos potenciais, contribuindo, em última análise, para o desenvolvimento de novas estratégias antiparasitárias.

6. Materiais e Métodos (Etapa 2)

6.1 Padrões, Solventes e Reagentes

Poli ϵ -caprolactona (PCL), Zeína e Pluronic F-68 foram obtidos da Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EUA), a pentamidina (PTD) foi adquirida da Sigma-Aldrich (Munique, Alemanha) com pureza mínima de 98%. Os reagentes de cultura celular foram obtidos da Gibco/Invitrogen (Carlsbad, CA, EUA). Todos os outros produtos químicos foram obtidos da Sigma-Aldrich (Munique, Alemanha), Merck (Munique, Alemanha) e Isofar (São Paulo, Brasil).

6.2 Desenvolvimento da nanoformulação

6.2.1 Preparo das nanopartículas de poli (ϵ -caprolactona) - PCL

As nanopartículas de PCL (NPCL) foram preparadas usando o método de emulsificação/evaporação do solvente descrito por Zhou et al, 2009. O método envolve a mistura de uma fase orgânica em uma outra fase aquosa. A fase orgânica é constituída de 100 mg de polímero (PCL), 30 mL de solvente orgânico (acetona), 200 mg de Miglyol® 810, 40 mg de tensoativo Span® 60 e 100 mg FDCM. A fase aquosa é composta por 30 mL de água contendo 60 mg de tensoativo Tween® 80. Após a dissolução dos compostos de ambas as fases, a fase orgânica foi inserida, lentamente, sob agitação magnética a fase aquosa com o auxílio de um funil. A suspensão resultante foi mantida sob agitação por 10 min e em seguida o solvente orgânico foi evaporado por pressão reduzida, utilizando um evaporador rotativo. A suspensão de nanopartículas foi evaporada até volume final de 10 mL. A

nanoformulação NPCL-FDCM 10 mg/mL foi armazenada em frasco âmbar a temperatura ambiente (25°C).

6.2.2 Preparo das nanopartículas de zeína

As nanopartículas de zeínas (NPZ) foram preparadas pelo método de precipitação por antissolvente (HU; MCCLEMENTS, 2014). Zeína (2% m/v) foi dissolvida overnight numa solução hidroetanólica (85% v/v), posteriormente foi realizado tratamento térmico por 15 minutos à 75°C e a solução resultante foi filtrada em filtro de seringa (0,45 µm – Millipore). Separadamente foi preparado uma solução de aquosa de Pluronic F-68 (2% m/v) e o pH da solução ajustado para 4. O composto ativo (10 mg de FDCM) foi dissolvido na solução de zeína (10 mL) e posteriormente esta solução será rapidamente injetada na solução de surfactante (30 mL) sob agitação magnética. A dispersão coloidal resultante será mantida sob agitação em temperatura ambiente por 10 minutos. A evaporação do etanol foi realizada em rotaevaporador rotativo para um volume final de 20 mL, sendo o volume perdido compensado com adição de água a pH 4. A nanoformulação NPZ-FDCM 0,5 mg/mL foi armazenada em frasco âmbar a temperatura ambiente (25°C).

6.3 Desenvolvimento da metodologia analítica de quantificação das brachydinas

A quantificação da fração diclorometânica foi realizada por cromatografia líquida de alta eficiência com detector de fotodiodos (HPLC-PDA), utilizando o sistema binário UltiMate 3000 (Thermo Scientific, Massachusetts, EUA) e detector VWD-3400RS.

6.3.1 Otimização das condições cromatográficas

As condições cromatográficas para a separação da fração e quantificação dos compostos presentes nos nanossistemas foram ajustadas, para a obtenção de um pico simétrico e um tempo menor de corrida. Os parâmetros foram ajustados a partir de trabalho prévio (Rocha et al., 2014), e estão descritos na Tabela 11.

Tabela 11. Condições cromatográficas ajustadas para a quantificação das brachydinas da FDCM nas nanopartículas.

Item	Parâmetro
Fase Móvel	A (água e ácido fórmico a 0,01%) e B (metanol e ácido fórmico a 0,01%)

Volume de injeção	20 µL
Fluxo	1 mL/min
Tipo de eluição	Gradiente 70% a 100% de B
Coluna Cromatográfica	Luna 5µm C18 100 A (150 mm x 4,6 mm)
Detector	Ultravioleta (UV), λ= 240 nm
Temperatura	Ambiente (25°C)
Corrida	25 min

6.3.2 Linearidade

No estudo de linearidade foi avaliado se a faixa de trabalho usada apresentava-se linear para cada brachydina presente na FDCM. Para isso, foram preparadas triplicadas de oito níveis de concentração (0,1 a 5,0 mg/mL). Cada curva analítica foi construída através da relação entre o sinal analítico apresentado e a concentração da substância de interesse. Os valores desta razão foram usados para obter a equação de regressão linear pelo método dos mínimos quadrados. O coeficiente de correlação quadrado (r^2) foi utilizado para avaliar a adequação da representação do modelo matemático expresso pela equação de reta. O software Origin 8.5® foi utilizado para produção do gráfico de cada brachydina. Um valor de r^2 maior que 0,990 foi requerido para considerar o modelo linear (AMARANTE Jr et al., 2001; BRITO et al., 2003; RIBANI et al., 2004; LANÇAS, 2009).

6.4 Caracterização Físico-Química das nanopartículas

6.4.1 Estabilidade Físico-Química

Para avaliar a estabilidade das formulações de nanopartículas de PCL e Zeína, foram determinados o tamanho (diâmetro hidrodinâmico), índice de polidispersão, potencial zeta, pH e eficiência de encapsulação em função do tempo (0, 7, 14, 21, 28, 42, 49 dias).

6.4.1.1 Diâmetro hidrodinâmico, índice de polidispersão e potencial zeta

A técnica de espectroscopia de correlação de fótons e de microeletroforese foi empregada para a determinação do diâmetro hidrodinâmico, índice de polidispersão e potencial zeta dos sistemas nanopartículas, respectivamente. As amostras foram diluídas com água (Milli-Q) e analisadas utilizando um ZetaSizer ZS 90 (Malvern®) a um ângulo fixo de 90° a 25 °C, utilizando uma célula volumétrica do equipamento NanoSight LM10, empregando um laser com comprimento de onda de 532 nm (verde),

câmera CMOS e software NanoSight (versão 3.1). Todas as medidas foram realizadas em triplicata.

6.4.1.2 Análise do pH

O pH das suspensões das nanopartículas foi medido no decorrer de 49 dias e utilizou-se um pHmetro (Tecnal®) previamente calibrado com soluções tampão em pH 7,0 e 4,0.

6.4.1.3 Eficiência de encapsulação

Para quantificar a eficiência de encapsulamento, esta foi determinada com base no método de ultrafiltração/centrifugação utilizando os ultrafiltros de celulose regenerada Microcon 10 kDa (Millipore), que permite a passagem apenas das substâncias não encapsuladas. A diferença entre a quantidade inicialmente adicionada e a quantidade não encapsulada dá a eficiência do encapsulamento. Para a quantificação dos ingredientes ativos nas soluções foi utilizada a cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), utilizando o sistema binário UltiMate 3000 (Thermo Scientific, Massachusetts, EUA) e detector VWD-3400RS utilizando método otimizado descrito na tabela 1.

6.4.2 Espectroscopia no Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR)

As análises de infravermelho foram realizadas com a finalidade de investigar a presença das brachydinas da FDCM nas nanopartículas de PCL e Zeína, bem como identificar os principais grupos funcionais presente nos componentes das formulações. Os experimentos foram realizados em um espectrofotômetro de FI-IR 660 Varian® em uma faixa de número de onda de 400 a 4000 cm^{-1} , utilizando 32 varreduras por amostra com resolução de 8 cm^{-1} . As amostras da fração DCM, as nanopartículas de PCL e Zeína contendo e não contendo a FDCM, assim como a mistura física entre os componentes foram analisadas utilizando o acessório de reflectância total atenuada (ATR), o qual permite a análise de compostos em pó, em pastas e aqueles que não podem ser analisados em forma de pastilhas ou filmes. O software Origin 8.5® foi utilizado para produção dos gráficos.

6.4.3 Calorimetria Diferencial Exploratória (CDE)

As análises das matérias-primas, da mistura física e das nanopartículas foram realizadas utilizando o DSC Q20 TA Instruments®. As amostras continham massa de 2 a 5mg, as quais foram pesadas em balança analítica e colocadas em cadinhos de alumínio selados com tampa. Como referência utilizou-se um cadinho com tampa, porém vazio. Os termogramas foram obtidos em atmosfera de nitrogênio (50mL/minuto). O programa térmico contemplou uma rampa de aquecimento dos 0 aos 400°C, com uma taxa de 10°C por minuto. O software Origin 8.5® foi utilizado para produção dos gráficos.

6.4.4 Microscopia de força atômica (MFA)

A morfologia das nanopartículas foi verificada por Microscopia Eletrônica de Transmissão (Zeiss-LEO 906) de acordo com o método previamente descrito (JOREZ et al., 2004).

A morfologia das nanopartículas foi avaliada pela técnica Microscopia de Força Atômica (MFA), usando um microscópio Nanosurf Easy Scan 2 Basic AFM -Pattern BT02217 (Nanosurf®, Suíça) com modo de não-contato. Suspensões diluídas das nanoformulações foram colocadas em placas de silício. Para garantir uma maior adesão das amostras na placa, estas foram previamente limpas para a remoção do dióxido de silício. As imagens foram capturadas no modo não contato com 256x256 pixels em formato TIFF, a uma taxa de varredura de 90 Hz e analisados utilizando o software Gwyddion®.

6.5 Ensaios Biológicos das nanopartículas

6.5.1 Manutenção das formas promastigotas de *L. amazonensis*

Formas promastigotas de *L. amazonensis* (MHOM/BR/1987/BA-125) foram cultivadas em meio Schneider (SIGMA), gentamicina (50 µg/mL) e suplementado com 10% de Soro Fetal Bovino (SFB) (GIBCO). A cultura foi mantida em incubadora de Demanda Bioquímica de Oxigênio (DBO), à 27°C. Formas promastigotas na fase estacionária de crescimento (4 dias de cultura) com motilidade flagelar foram usadas nos experimentos (BEZERRA et al., 2006; REIS et al., 2012).

6.5.2 Diferenciação das formas promastigotas em amastigotas axênicas de *L. amazonensis*

Para obtenção das formas amastigotas axênicas de *L. amazonensis*, foram utilizadas formas promastigotas ($5,0 \times 10^7$ /mL) em fase estacionária de crescimento. O cultivo foi feito em meio Schneider com pH 5,5 e suplementado com 5% de SFB e mantido a 32°C em estufa DBO por 96h. Ao final uma alíquota foi retirada para avaliação morfológica das formas amastigotas, através de coloração em Giemsa e análise microscópica (CYSNE-FINKELSTEIN et al., 1998; TEIXEIRA et al., 2002; SOUSA, 2014).

6.5.3 Atividade Antileishmania in vitro

Inicialmente, para avaliação do efeito sobre a proliferação das formas promastigotas de *L. amazonenses*, os parasitos (5×10^7 células/mL) foram tratados com concentrações da nanopartícula de PCL (NPCL-FDCM) variando de 500 a 0,24 µg/mL, em triplicata, e cultivados por 48 horas, a 26°C, em um volume final de 100 µL de meio Schneider suplementado. O controle negativo foi constituído de formas promastigotas cultivadas somente com meio Schneider suplementado e DMSO a 1%. A droga padrão, Pentamidina® (IC₅₀ 4 µg/mL), foi usada como controle positivo. Ao final, foi avaliada a citotoxicidade pelo ensaio de MTT. Para a nanopartícula de zeína (NPZ-FDCM), foi realizado o mesmo protocolo descrito acima, contudo as concentrações utilizadas variaram de 125 a 0,06 µg/mL, em triplicata.

Para avaliar a atividade sobre as formas amastigotas axênicas, os parasitos (1×10^6 /poço) foram tratados com concentrações seriadas (125 a 0,06 µg/mL para NPZ-FDCM), em triplicata e cultivados por 24 horas à 32°C em meio Scheneider suplementado e com pH de 5,5. Formas amastigotas somente em meio Schneider suplementado e DMSO a 1% foram usadas como controle negativo. Pentamidina (50 a 1,56 µg/mL) foi usada como controle positivo. Ao final, foi avaliada a citotoxicidade pelo ensaio de MTT.

6.5.4 Manutenção de macrófagos RAW 264.7

Os macrófagos de linhagem murina RAW 264.7 (doados pelo Professor André Moraes Nicola do Laboratório de Biologia Molecular – UnB) foram mantidos em garrafas de cultivo celular estéreis com meio RPMI-1640 (SIGMA) contendo penicilina (100 µg/mL), estreptomicina (100 U/mL), anfotericina B (0,25 µg/mL) e suplementado com 10% de Soro Fetal Bovino (SFB) em estufa a 5% de CO₂ a 37 °C.

6.5.5 Ensaio de citotoxicidade em macrófagos RAW 264.7 *in vitro*

Para avaliar a citotoxicidade em células normais, macrófagos da linhagem RAW 264.7 (2×10^5 de células/mL) foram cultivados em placa de 96 poços, utilizando as mesmas concentrações testadas para as duas nanoformulações nas formas promastigotas de *L. amazonensis*, em meio RPMI suplementado. O ensaio foi realizado em triplicata com volume final de 100 µL por poço, e cultivado a 37°C e 5% de CO₂. Poços com células cultivadas somente em meio RPMI suplementado e DMSO a 1% foram usados como controle negativo. Poços com DMSO a 100% foram usados controle positivo. Após 48h, a viabilidade celular foi avaliada através do ensaio de MTT.

6.5.6 Ensaio de MTT

Para avaliar a viabilidade das formas promastigotas e amastigotas axênicas de *L. amazonensis* e dos macrófagos RAW 264.7 tratados com cada nanoformulação (NPZ-RAB e NPCL-RAB), foi usado o ensaio de MTT. Este ensaio consiste na conversão do sal 3-(4,5-dimetil-2-tiazol)-2,5- difenil-brometo de tetrazólio (MTT), solúvel em água e de coloração amarela, em cristais insolúveis de formazan, de cor púrpura. A conversão ocorre em células viáveis e metabolicamente ativas, por meio da ação da enzima mitocondrial Succinato Tetrazolium Redutase. Assim, é possível quantificar as células vivas (STOCKERT et al., 2018).

Em resumo, após o período de incubação, as placas foram centrifugadas, e o sobrenadante removido e substituído por 100 µL de meio específico contendo MTT (5 mg/mL). Em seguida, as placas foram incubadas nas mesmas condições de cultivos das células e na ausência de luz. Três horas depois, as placas foram centrifugadas e o formazan dissolvido em 100µL de DMSO. A absorbância foi medida usando com um leitor de placas (BioTek EL×800) a 540 nm. (KUMAR et al., 2018).

7. Resultados e Discussão (Etapa 2)

7.1 Desenvolvimento da metodologia analítica para quantificação das bradyquinas nas nanopartículas

7.1.1 Otimização das condições cromatográficas

A Figura 21 mostra o cromatograma da FDCM após ajuste das condições cromatográficas. Pode-se observar picos simétricos para as três brachydinas, tendo a brachydina 1 um tempo de retenção de aproximadamente 5,1 minutos, a brachydina 2 um tempo de retenção de aproximadamente 12,7 minutos e a brachydina 3 um tempo de retenção de aproximadamente 14,3 minutos.

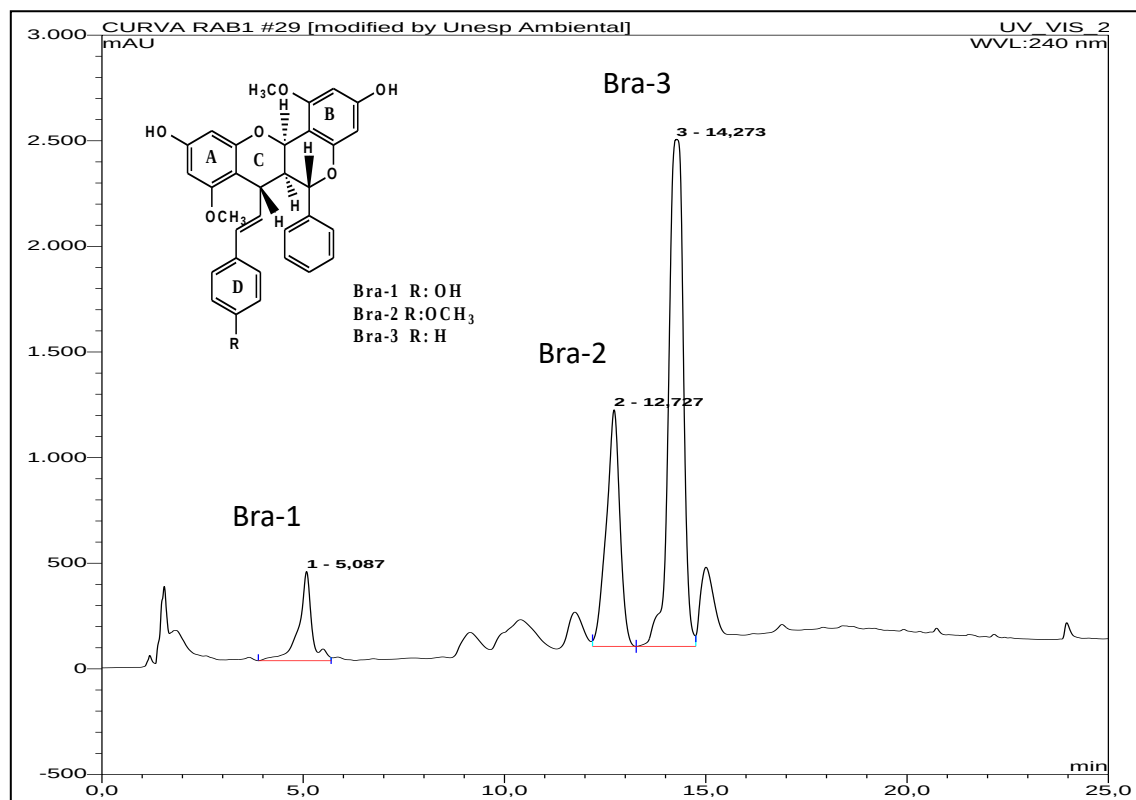


Figura 21. Perfil cromatográfico da fração diclorometânica (FDCM) do extrato hidroetanólico das raízes de *Fridericia platyphylla* ($\lambda = 240$ nm).

7.1.2 Linearidade

As curvas analíticas mostram a resposta do equipamento frente às concentrações conhecidas apresentadas a ele. A figura 22 apresenta os gráficos correspondentes às curvas analíticas para as três brachydinas presente na FDCM, juntamente com os parâmetros obtidos com a regressão linear da curva analítica.

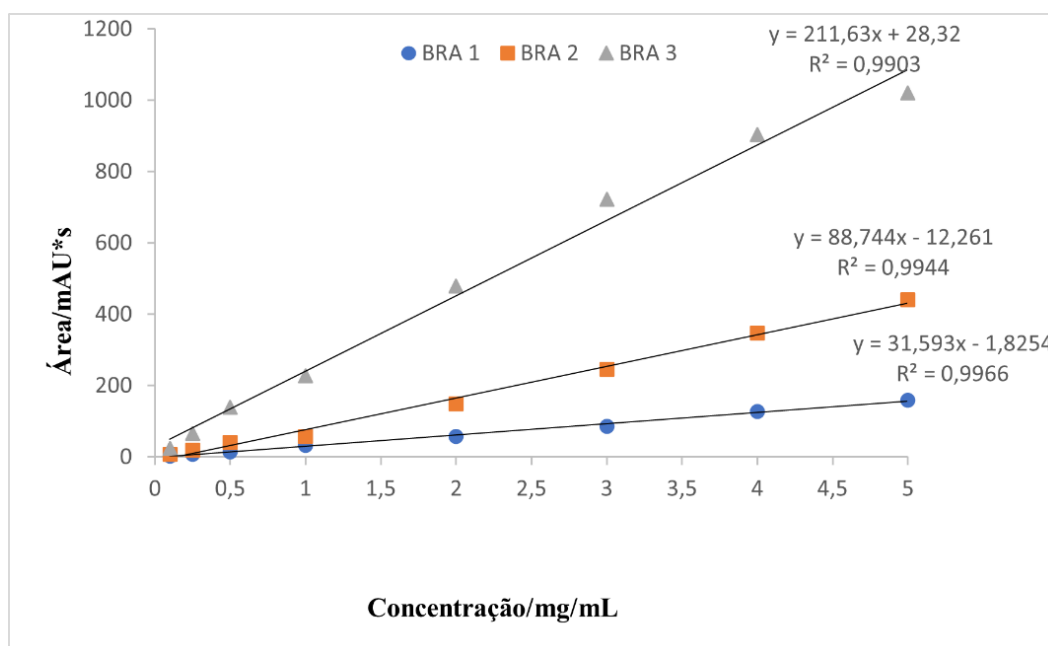


Figura 22. Curva analítica obtida para três brachydinas. Valores representam a média de dois experimentos realizados em triplicata (n=8).

As curvas analíticas para as três brachydinas mostraram-se lineares ao longo da faixa de trabalho estudada, apresentando coeficientes de correlação (r^2) satisfatórios uma vez que foram obtidos valores maiores que 0,990 para o BRA1, BRA2 e BRA3, ou seja, correlação fortíssima (ANVISA, 2003; BRITO et al., 2003; INMETRO, 2010). Os dados das curvas analíticas estão simplificados na Tabela 12.

Tabela 12. Padrões utilizados no desenvolvimento do estudo

Composto	t_r (min)	Faixa de trabalho (mg.mL ⁻¹)	Equação da reta	r^2
BRA1	5,1	0,1–5,0	$y = 31,593x - 1,8254$	0,9966
BRA2	12,7	0,1–5,0	$y = 88,744x - 12,261$	0,9944
BRA3	14,3	0,1–5,0	$y = 211,63x + 28,32$	0,9903

r^2 = coeficientes de correlação das retas.

7.2 Caracterização Físico-Química das nanopartículas

7.2.1 Diâmetro hidrodinâmico, índice de polidispersão e potencial zeta

A técnica de Espalhamento Dinâmico de Luz (Dynamic Light Scattering, DLS) é utilizada para avaliar o diâmetro hidrodinâmico ou tamanho de partículas em suspensão, e pode ser afetada por inúmeros parâmetros como a composição da formulação (tipo de material, tipo de ativo, tipo de surfactante, entre outros), o método de análise, as condições de preparo da amostra (temperatura, agitação, pressão entre outros) e a forma de armazenamento

(MARCATO, 2009). A tabela 13 apresenta o diâmetro hidrodinâmico (Dh) médio em nanômetros (nm) das nanopartículas em função do tempo.

Tabela 13. Resultado do diâmetro hidrodinâmico (Dh) para as nanopartículas

Tempo (dias)	Amostra	
	NPZ-FDCM 0,5 mg/mL	NPCL-FDCM 10 mg/mL
0	206,03 ± 4,63	311,3 ± 3,691
7	121,60 ± 1,951	321,7 ± 7,681
14	138,50 ± 1,627	313,9 ± 7,406
21	133,90 ± 1,143	322,5 ± 0,981
28	133,20 ± 0,432	332,0 ± 2,51
35	136,97 ± 0,865	326,3 ± 2,123
42	139,90 ± 1,846	328,7 ± 0,785
49	150,00 ± 2,342	333,8 ± 0,294

Os resultados são expressos em Média ± DP de 3 medidas realizadas pelo equipamento para cada amostra (n=8).

As nanopartículas de zeína (NPZ-FDCM) apresentaram Dh médio inicial de 206,03 ± 4,63 nm e após 7 dias de armazenamento observou-se uma diminuição significativa do Dh médio para 121,60 ± 1,951 nm em relação ao tempo inicial, seguido de um aumento não significativo após 14 dias para 138,50 ± 1,627 nm, permanecendo nesta faixa até 42 dias de armazenamento indicando que não houve formação de agregados e desestabilização do sistema, uma vez que não foi observada a precipitação destas nanopartículas. Apesar de um certo aumento no Dh médio com 49 dias de armazenamento (150,00 ± 2,342 nm) não se observou a formação de agregados ou precipitação do sistema, indicando assim que a formulação permaneceu praticamente estável, apresentando pequenas variações ao longo deste período. A análise de distribuição de tamanho para as nanopartículas de zeína mostraram um perfil unimodal, ou seja, a existência de apenas um tipo de população de nanotransportadores.

Já as nanopartículas de PCL (NPCL-FDCM) apresentaram diâmetro médio inicial de 311,3 ± 3,691 nm e não foram observadas alterações significativas no diâmetro médio até 49 dias de armazenamento (333,8 ± 0,294 nm), indicando que a formulação se manteve praticamente estável durante todo o ensaio. Assim como observado para as nanopartículas de zeína, não foi observado a sedimentação destas nanopartículas após o período de estudo. A análise de distribuição de tamanho para as nanopartículas de PCL apresentaram ao longo do tempo valores muito próximos entre si verificando-se uma distribuição de tamanho homogênea, e um perfil unimodal de nanotransportadores.

O índice de polidispersão (IP), o qual indica a distribuição de tamanho das nanopartículas em função da distribuição de tamanho média, ou seja, um baixo índice de polidispersão indica que as partículas estão em uma estreita faixa de tamanho. Valores abaixo de 0,2 para o índice de polidispersão são considerados bons indicadores de estabilidade (MOHANRAJ;CHEN, 2006). A tabela 14 apresenta os valores de índice de polidispersão para as duas nanoformulações em função do tempo. Observa-se que ocorreram variações na polidispersão em função do tempo em ambas as nanopartículas, no entanto, estas variações podem estar relacionadas a erros experimentais ou até mesmo a reorganização na distribuição de tamanho das partículas, porém todas as formulações apresentaram valores igual ou abaixo de 0,2 durante 49 dias de armazenamento, evidenciando a boa estabilidade dos nanotransportadores, indicando uma distribuição de tamanho de partículas homogênea e monodispersa.

Tabela 14. Resultado do índice de polidispersão (PDI) para as nanopartículas

Tempo (dias)	Amostra	
	NPZ-FDCM 0,5 mg/mL	NPCL-FDCM 10 mg/mL
0	0,207 ± 0,05	0,135 ± 0,015
7	0,147 ± 0,03	0,160 ± 0,014
14	0,190 ± 0,01	0,089 ± 0,058
21	0,172 ± 0,01	0,105 ± 0,004
28	0,174 ± 0,01	0,090 ± 0,061
35	0,164 ± 0,01	0,048 ± 0,044
42	0,154 ± 0,03	0,101 ± 0,009
49	0,180 ± 0,02	0,080 ± 0,008

Os resultados são expressos em Média ± DP de 3 medidas realizadas pelo equipamento para cada amostra (n=8).

Outro parâmetro utilizado para acompanhar a estabilidade das nanopartículas foi o potencial zeta (ζ). Ele reflete a carga de superfície das nanopartículas, sendo influenciado pela composição da partícula, o meio dispersante, pH e a força iônica do meio (GREENWOOD, 2003). Geralmente, quando maior o valor numérico (em módulo) do potencial zeta, maior será a estabilidade das suspensões coloidais, pois a força de repulsão de cargas entre as partículas é maior, evitando agregação. Nanopartículas com potencial zeta de aproximadamente (+/-) 30 mV são mais estáveis em suspensão (SCHAFFAZICK *et al.*, 2003). A tabela 15 apresenta os valores do potencial zeta para as duas nanoformulações em função do tempo.

Tabela 15. Resultado do potencial zeta (ζ) para as nanopartículas

Tempo (dias)	Amostra	
	NPZ-FDCM 0,5 mg/mL	NPCL-FDCM 10 mg/mL
0	5,0 $\pm$ 0,11	-31,1 $\pm$ 0,08
7	3,2 $\pm$ 0,86	-38,6 $\pm$ 0,31
14	9,9 $\pm$ 0,46	-32,3 $\pm$ 0,54
21	14,7 $\pm$ 0,79	-33,5 $\pm$ 0,43
28	17,7 $\pm$ 0,67	-31,3 $\pm$ 0,81
35	12,3 $\pm$ 0,37	-30,2 $\pm$ 0,40
42	19,8 $\pm$ 0,22	-29,3 $\pm$ 0,37
49	11,6 $\pm$ 1,27	-30,2 $\pm$ 0,25

Os resultados são expressos em Média $\pm$ DP de três medidas realizadas pelo equipamento para cada amostra (n=8).

Pode-se observar que as formulações contendo zeína apresentaram um valor médio de ζ de aproximadamente 11,8 mV, considerado um valor de estabilidade limitada para formulações em escala nano (MOHANRAJ;CHEN, 2006). Embora tenha sido observado alterações no valor de potencial zeta de todas as nanoformulações, estas foram produzidas empregando o Pluronic como agente de estabilização, e este surfactante estabiliza as nanopartículas através de impedimento estérico (WULFF-PÉREZ et al., 2012), desta forma, estas alterações nos valores deste parâmetro não é necessariamente um indicativo de instabilidade das nanoformulações.

Em relação as formulações de NPCL, todas as amostras analisadas apresentam valores negativos de potencial zeta e um valor médio de aproximadamente -32,1 mV, sendo consideradas fisicamente estáveis (MISHRA et al., 2009). Grande parte da estabilidade das partículas ocorre devido a efeitos estéricos (efeito osmótico) e camada de hidratação (aumento da distância entre as partículas) conferida pelos estabilizantes, tais como o Tween, que foi utilizado em todas as formulações de NPCL do presente estudo. Os polímeros constituintes das nanopartículas também podem influenciar nesta estabilidade e são os principais componentes presentes nas formulações capazes de influenciar o potencial zeta, em especial os poliésteres, tais como PCL. Estes polímeros fornecem um potencial negativo à interface, devido aos grupamentos carboxílicos resultantes das hidrólises da cadeia (MOSQUEIRA et al., 2000; SCHAFFAZICK et al., 2003), o que consequentemente acarretou um potencial zeta negativo nas amostras de NPCL deste estudo.

7.2.2 Análise do pH

Monitorar o pH de sistemas em função do tempo traz informações relevantes para indicar a estabilidade química dos componentes da formulação. Alterações nos valores de pH podem indicar processos de degradação de componentes da formulação e desta forma, afetarem a estabilidade dos sistemas. O pH das nanopartículas foram medidos no decorrer de 49 dias. A figura 23 apresenta os valores de pH para as formulações de NPZ e NPCL (contendo e não contendo a FDCM).

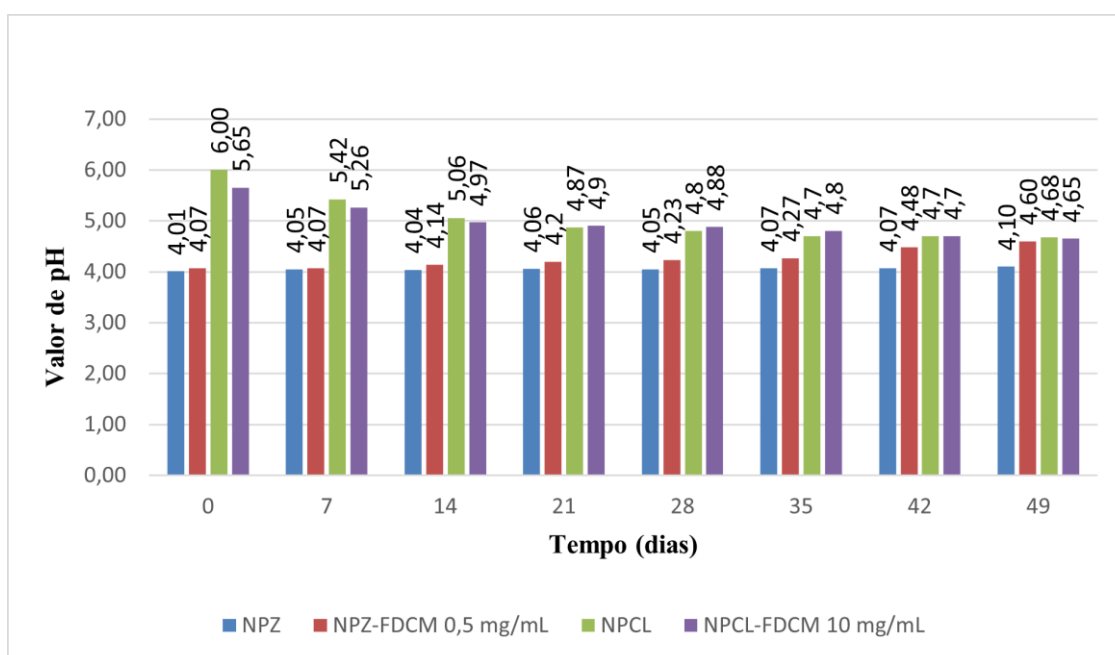


Figura 23. Perfil do pH das formulações de NPZ e NPCL contendo e não contendo a FDCM em função do tempo.

As nanopartículas zeína apresentaram pH de 4,07 e após 49 dias de armazenamento houve um aumento do pH para 4,6. De acordo com (HU; MCCLEMENTS, 2014) o principal desafio em se trabalhar com nanopartículas de zeína é que em soluções aquosa estas tendem a formar agregados devido à alta hidrofobicidade superficial. As nanopartículas de zeína apresentam baixa estabilidade frente ao pH, apresentando agregação das partículas em pH entre 5 e 6,5. Uma maneira de diminuir a atração hidrofóbica das nanopartículas de zeína é através do recobrimento das nanopartículas com materiais que aumentem a repulsão eletroestática ou estérica destas nanopartículas (CHUACHAROEN; SABLIOV, 2016), como por exemplo com a utilização de compostos com comportamento anfifílico, tais como o Pluronic F68, que deixam grupamentos hidrofílicos ficarem mais expostos na superfície e assim possam contribuir para estabilização das interações entre os

aminoácidos presentes na proteína zeína, melhorando a estabilidade do sistema em solução, o aumento significativo do pH e minimizando o efeito de agregação.

As nanopartículas de PCL apresentaram pH inicial de 5,65 e após 49 dias de armazenamento houve uma diminuição do pH para 4,65. Geralmente, a mudança no pH pode sugerir que o polímero está se deteriorando. No entanto, informações de Schaffazick e Guterres (2003) e Grillo et al. (2019) indicam que o polímero PCL demonstra uma diminuição na sua massa molecular em suspensões de nanocápsulas e nanoesferas no período de poucos meses de armazenamento, resultando na redução do pH das formulações. Segundo os mesmos autores, a diminuição rápida nos valores de pH das suspensões coloidais de polímeros pode ser atribuída à ionização de grupos carboxílicos presentes no polímero ou à hidrólise, dependendo da hidrofobicidade do poliéster. De acordo com um estudo de Schaffazick et al. (2002), suspensões de nanopartículas preparadas com PCL apresentaram uma diminuição nos valores de pH ao longo de um período de 3,5 meses. Esse fenômeno foi explicado pelo aumento da exposição de grupos ácidos carboxílicos terminais devido ao tempo, resultante do relaxamento das cadeias poliméricas, contudo tal fato não inviabilizou as nanopartículas.

7.2.3 Eficiência de encapsulação

A eficiência de encapsulação das formulações em função do tempo foi estudada para avaliar a estabilidade da FDCM nas nanopartículas. Inúmeros são os fatores que podem influenciar na taxa de encapsulação dos ativos em sistemas nanoestruturados, entre os principais temos: as características físico-químicas do ativo (solubilidade), o tipo de tensoativo, características do polímero, pH do meio e a quantidade de ativo utilizada (SCHAFFAZICK et al., 2003; GRILLO et al., 2019). A figura 24 apresenta a taxa de encapsulação (%) da fração nas nanoformulações de PCL e zeína em função do tempo.

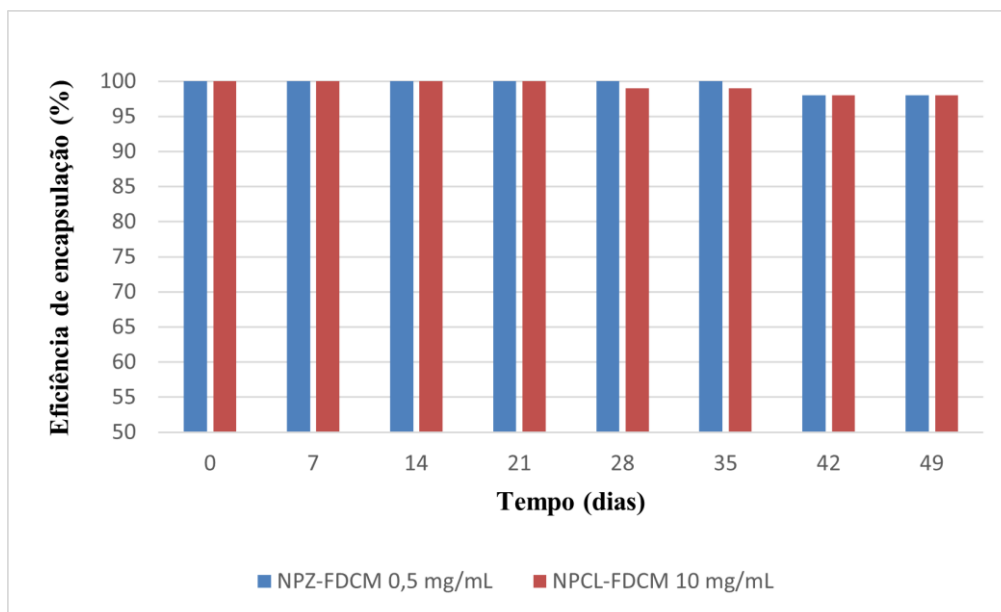


Figura 24. Eficiência de encapsulação (%) da FDCM nas nanopartículas NPZ e NPCL em função do tempo, determinação em triplicata (n=3).

Tanto as nanopartículas de PCL como as de zeína contendo a FDCM tiveram uma taxa de encapsulação média de 99% respectivamente. Observou-se que não ocorreram grandes alterações na eficiência de encapsulação no decorrer do tempo de estudo mostrando que essa metodologia se mostrou eficiente para nanoencapsular a FDCM da *Fridericia platyphylla*.

7.2.4 Espectroscopia no Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR)

Com o propósito de observar evidências na interação da FDCM com as nanopartículas, foram coletados espectros na região do infravermelho para a FDCM, as nanopartículas de PCL (NPCL-FDCM) e Zeína (NPZ-FDCM) contendo a FDCM, assim como os componentes das nanopartículas, como podemos observar nas figuras 25 e 26.

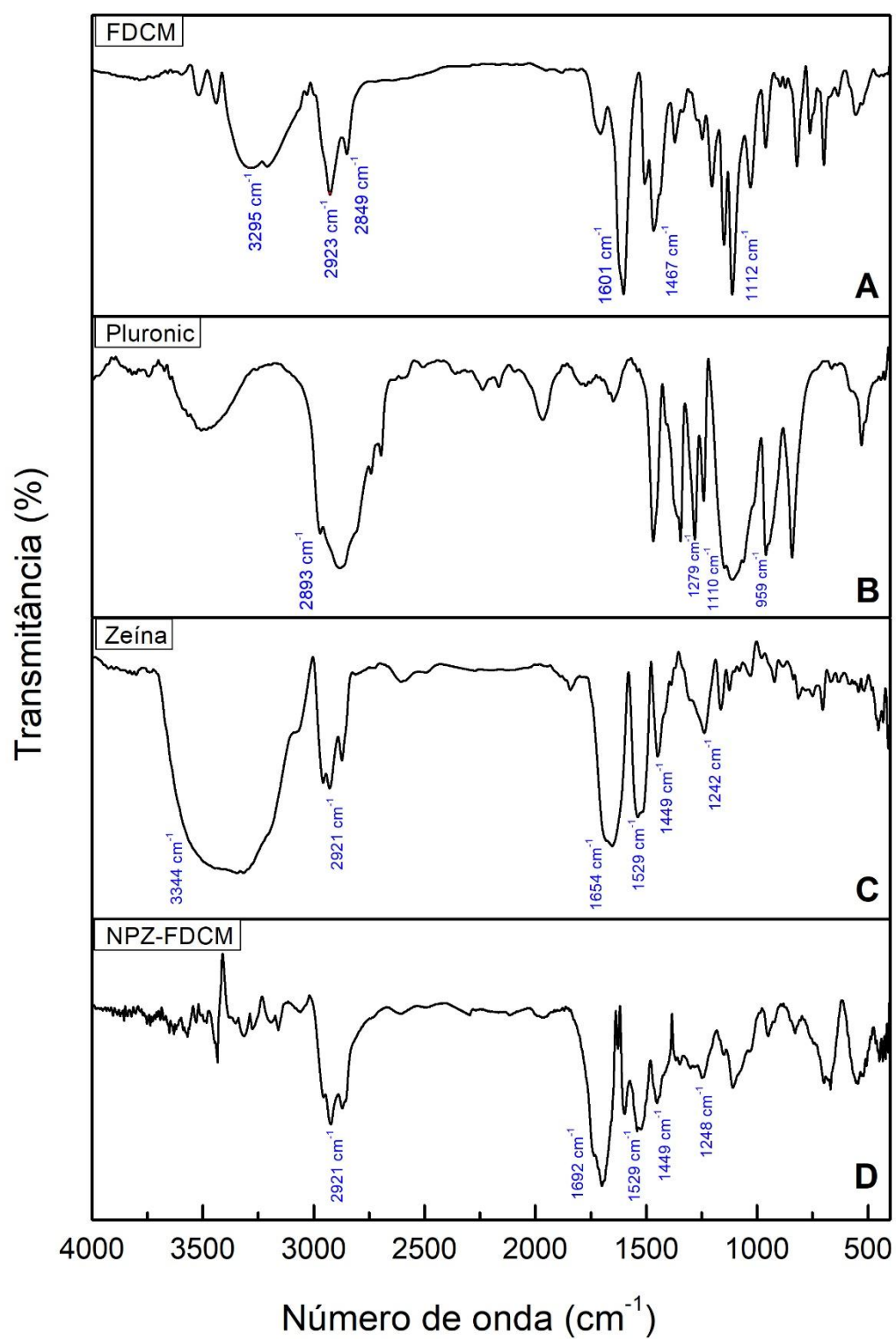


Figura 25. Espectro de infravermelho para: FDCM (A), pluronic F-68 (B), zeína pura (C) e nanopartícula de zeína (NPZ-FDCM) contendo a FDCM (D).

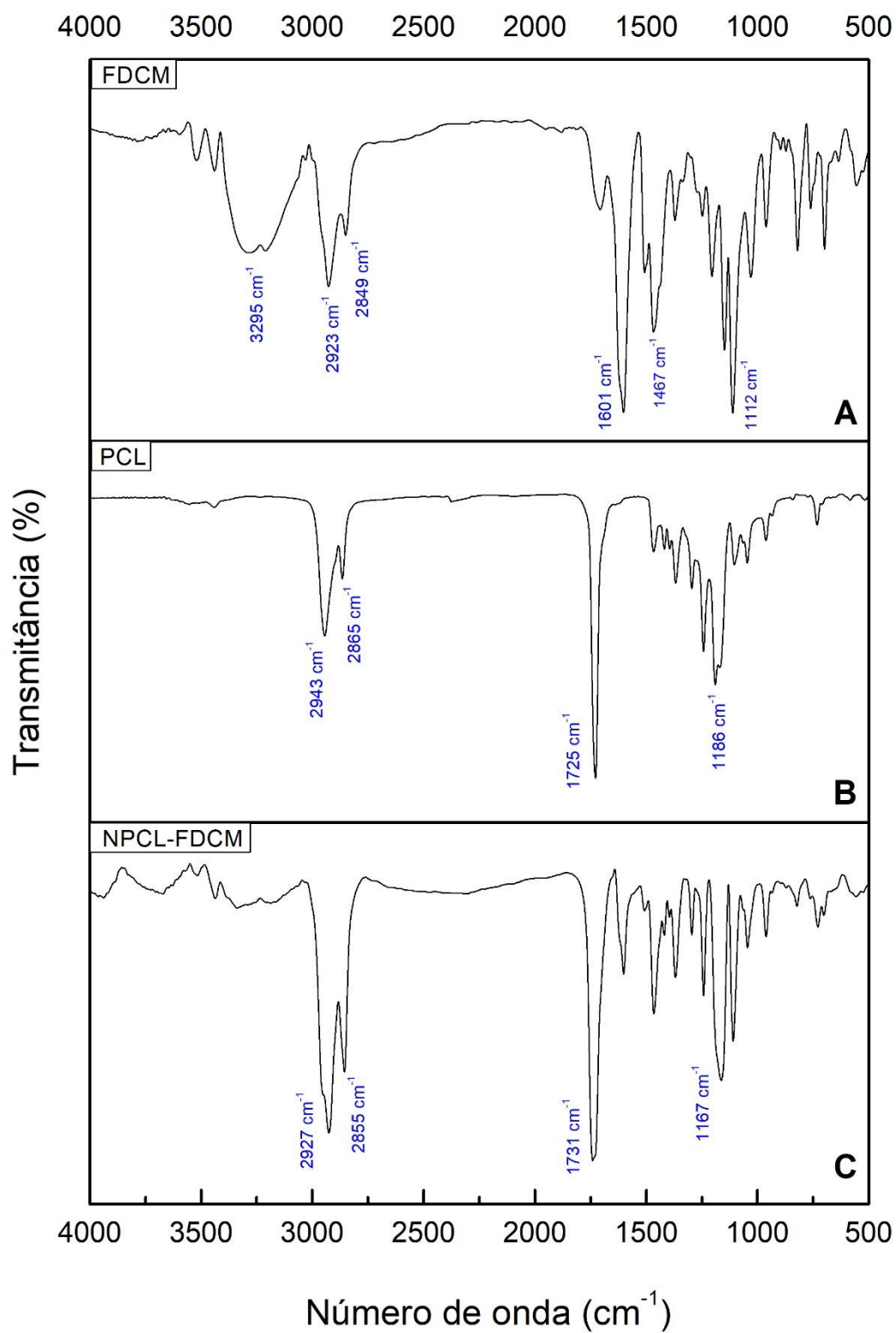


Figura 26. Espectro de infravermelho para: FDCM (A), PCL (B), e nanopartícula de PCL (NPCL-FDCM) contendo a FDCM (C).

Analizando as Figuras 25A e 26A, que é referente a FDCM, destacou-se a presença de bandas específicas alusivas aos grupos O-H de fenol, na região 3295 cm^{-1} . Também, nota-se nas regiões 2849 e 2923 cm^{-1} as vibrações do estiramento C-H de alcanos, já em 1601 e 1467 cm^{-1} destacam-se as vibrações específicas de C=C aromáticas, além das ligações CO observadas em 1112 cm^{-1} . Estes dados corroboram com achados de RMN de Rocha et al., 2014 para as três brachydinas presentes na FDCM.

Para o pluronic (FIGURA 25B) as principais bandas encontradas foram em 2893 cm^{-1} correspondentes a vibrações das ligações C-H, em $959/1110\text{ cm}^{-1}$ estiramentos de vibração correspondentes a ligação C-O (simétricas e assimétricas respectivamente) do grupo éter e em 1279 cm^{-1} vibração correspondente ao grupo CH_2 . (SILVERSTEIN et al., 2012; NASCIMENTO et al., 2018)

Como esperado, o espectro de zeína pura (FIGURA 25C) mostrou as bandas características correspondentes às amidas I, II e III em 1654 (estiramento C=O), 1529 (deformação NH e estiramento CN) e 1242 cm^{-1} , respectivamente. O pico em 3344 corresponde ao estiramento NH. Nota-se também no espectro da zeína a presença de banda referente às ligações C-H, que fica na região espectral entre 2921 cm^{-1} , que são consequentes da presença de aminoácidos e dos ácidos graxos, além da presença dos estiramentos CH_2 , predominantes de proteínas e de lipídios, são notados na região entre 1300 e 1500 cm^{-1} (SILVERSTEIN et al., 2012; SHAMSHAD et al., 2014).

Nos espectros correspondente a nanopartícula de zeína (FIGURA 25D) pode-se observar que as bandas características da zeína estão presentes na nanopartícula e que as bandas características da FDCM não estão presentes na nanopartícula carregada com este ativo, um indicativo de que ele está encapsulado. Assim, nota-se que ocorre interação entre a zeína junto dos grupos que são hidrofóbicos presentes na FDCM. Tais resultados também evidenciaram que nenhuma banda surgiu após a interação entre as nanopartículas e a fração, o que indica que ocorreram essencialmente as interações físicas e não as químicas (WU et al., 2012).

No espectro de infravermelho de PCL (Figura 26B), observou-se bandas de absorção na região de 2943 e 2865 cm^{-1} características da ligação C-H de metileno (CH_2), em 1721 cm^{-1} devido ao estiramento do grupo carbonila (C=O) característico do grupo éster e em 1186 cm^{-1} deformação angular C-O (MOHAMED et al., 2007; PAVIA et al., 2012).

Nos espectros correspondente a nanopartícula de PCL (FIGURA 26C) pode-se observar que as bandas características de PCL estão presentes na nanopartícula e que as bandas características da FDCM desapareceram, demonstrando que não há interação físico-química entre os componentes da formulação que tenha promovido alteração na estrutura química da FDCM. Esse achado é um indicativo de que ele pode estar completamente encapsulado. Outros estudos da literatura utilizando o PCL para o desenvolvimento de nanopartículas poliméricas mostraram resultados semelhantes para o encapsulamento de ativos derivados de produtos vegetais (DA SILVA et al., 2020).

7.2.5 Calorimetria Diferencial Exploratória (CDE)

Com o intuito de uma melhor caracterização e observação da interação da FDCM com as nanopartículas, foram realizadas as análises de CDE como descritos no item 4.17.3. Os resultados de CDE são apresentados na Figura 27 e 28, onde temos o fluxo de calor (W/g) em função da temperatura (°C). Foram realizadas análises para a FDCM, as nanopartículas de Zeína (NPZ-FDCM) e PCL (NPCL-FDCM) contendo a FDCM, assim como os componentes das nanopartículas.

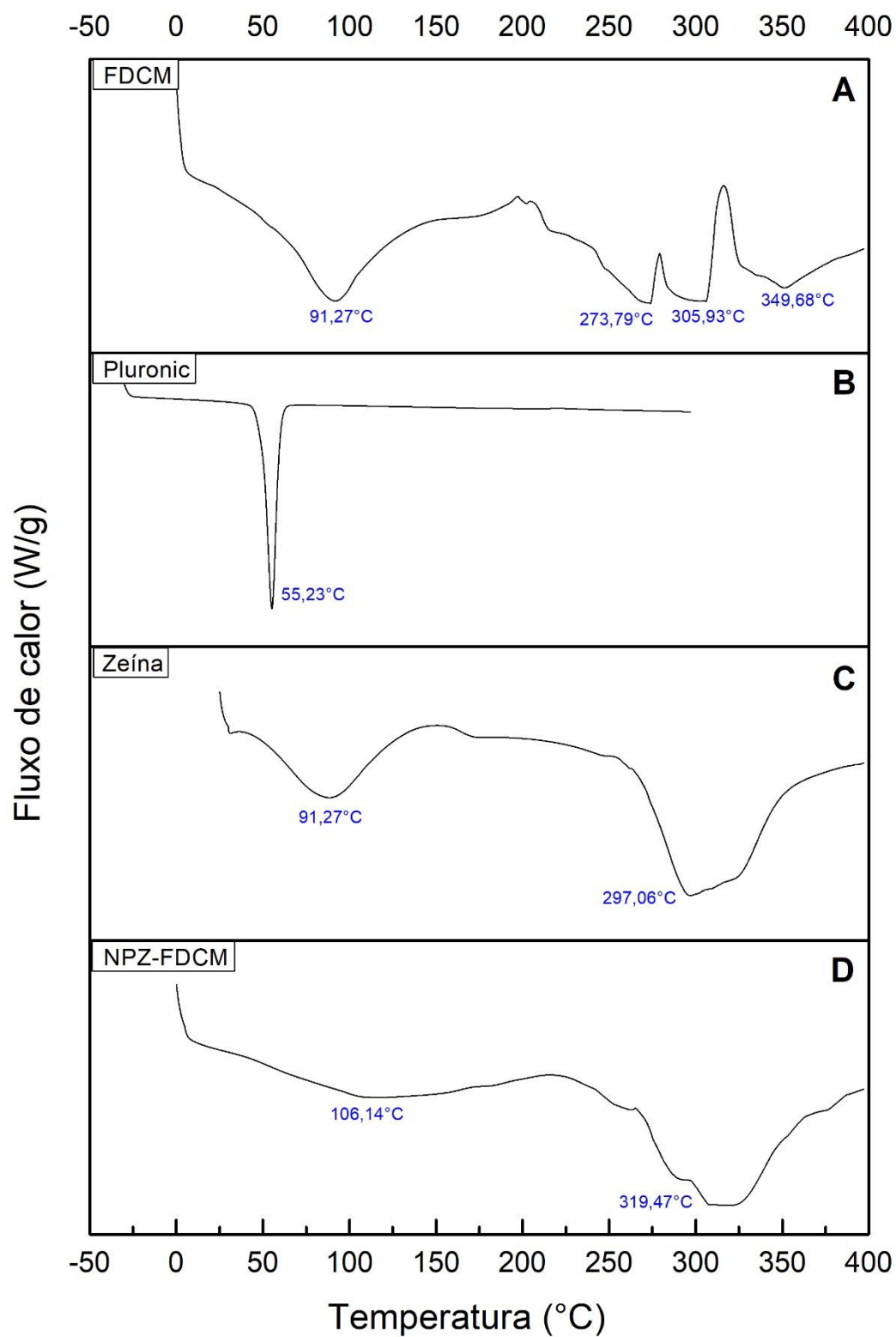


Figura 27. Termograma de Calorimetria Diferencial Exploratória para: FDCM (A), pluronic F-68 (B), zeína pura (C) e nanopartícula de zeína (NPZ-FDCM) contendo a FDCM (D).

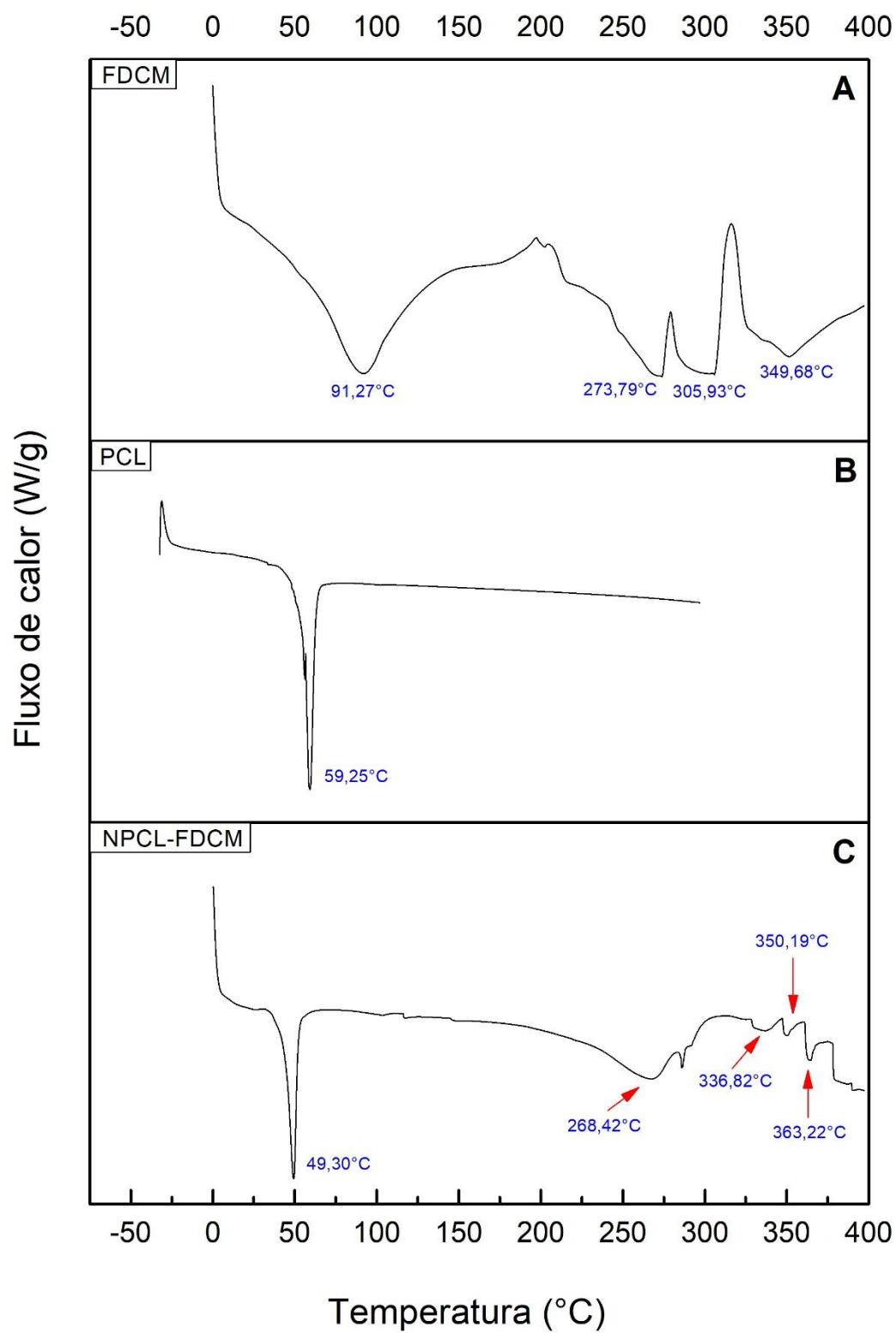


Figura 28. Termograma de Calorimetria Diferencial Exploratória para: FDCM (A), PCL (B), e nanopartícula de PCL (NPCL-FDCM) contendo a FDCM (C).

Verificou-se que a curva de CDE da FDCM (FIGURA 27A e 28A) apresentou quatro eventos térmicos endotérmicos. O primeiro em 91,27 °C, provavelmente relacionada a perda de água e de constituinte voláteis presentes na amostra (COSTA et al., 2013). Em 273,79°C, 305,93°C e 349,68°C ocorreram o segundo, terceiro e quarto eventos térmicos, provavelmente relacionados a fusão das três brachydinas presentes na fração. Na literatura consultada, não foram encontradas referências de estudos de caracterização de CDE da espécie vegetal *F. platyphylla* e/ou de suas frações, não sendo possível comparar seu comportamento térmico.

O termograma do pluronic (FIGURA 27B) mostra um pico endotérmico bem definido, estreito e de grande amplitude a 55,23°C. Valores semelhantes foram encontrados por Salay e colaboradores (2018). O termograma da zeína (FIGURA 27C) apresentou dois picos alargados e endotérmicos, um em 91,27°C, um pouco acima do encontrado na literatura (73°C) possivelmente devido a hidratação da proteína (LUO et al., 2014), e o segundo pico em 297,06°C.

A nanopartícula NPZ-FDCM (FIGURA 27D) exibiu picos por volta de 106,14°C e 319,47°C, isso mostra um deslocamento dos picos endotérmicos, evidenciando uma possível interação entre o ativo e os constituintes da nanopartícula. Dai et al. 2017, sugere que o aumento na temperatura de degradação de partículas de zeína/lectina carregadas com curcumina deve-se a um aumento nas efeitos hidrofóbico e interação eletrostática entre os componentes das partículas. Resultados semelhantes foram encontrados quando se aumenta a concentração de goma laca na formação de nanopartículas de zeína e que o tamanho da nanopartícula pode ter influência para uma melhor estabilidade térmica (CHEN et al., 2018) O deslocamento dos picos endotérmicos e a ausência de picos referentes aos ativos evidencia também que não há quantidades significativas do ativo fora da nanopartícula, fato este que corrobora para os resultados encontrados nos ensaios de eficiência de encapsulação.

O termograma do PCL (FIGURA 28B) mostra um pico endotérmico bem definido, estreito e de grande amplitude a 59,25°C. Valores semelhantes foram encontrados por França e colaboradores (2018). A nanopartícula NPCL-FDCM (FIGURA 28C) apresentou cinco eventos térmicos, o primeiro em 49,30°C, referente, provavelmente, ao pico do PCL puro, que mesmo com um leve deslocamento manteve o perfil. Já os demais eventos térmicos exibiram picos por volta de 268,42°C, 336,82°C, 350,19°C e 363,22°C, isso mostra um deslocamento dos picos endotérmicos da FDCM, evidenciando uma possível interação entre o ativo e os

constituintes da nanopartícula de PCL. O deslocamento dos picos endotérmicos e a presença de quantidades significativas do ativo fora da nanopartícula não evidencia que houve falhas na encapsulação do ativo, fato este apoiado pelos resultados encontrados nos ensaios de eficiência de encapsulação para a NPCL-FDCM.

7.2.6 Microscopia de força atômica (MFA)

Para verificar os aspectos morfológicos das nanopartículas de zeína e PCL contendo o FDCM foi utilizada a técnica de microscopia de força atômica e soluções das nanopartículas foram depositadas e secas sobre um suporte de silício, conforme descrito no item 6.4.4. As imagens foram coletadas para NPZ e NPCL contendo a FDCM e são apresentadas na figura 29.

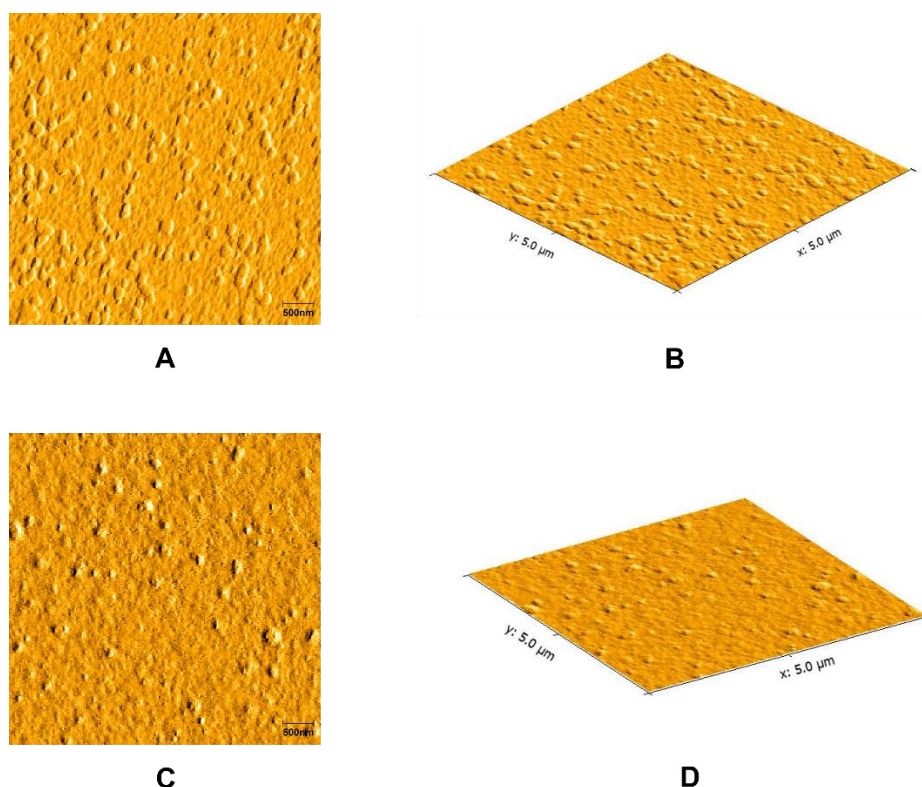


Figura 29. Imagens de microscopia de força atômica das nanopartículas de: NPZ-FDCM 2D (A), NPZ-FDCM 3D (B), NPCL-FDCM 2D (C) e NPCL-FDCM 3D (D).

A análise das imagens de MFA das nanopartículas de zeína e PCL com a FDCM mostraram que as partículas se apresentaram aspecto arredondadas com distribuição de tamanho uniforme, não sendo observada a presença de agregados. O tamanho médio das partículas de NPZ-FDCM ficou compreendido em 163 ± 25 nm e para a NPCL-FDCM em 280 ± 60 nm. Os tamanhos médios encontrados neste trabalho

estão condizentes com valores reportados para nanopartículas lipídicas e poliméricas (Schaffazick et al., 2003). Abamor et al. 2018, relataram tamanhos semelhantes para nanopartículas de poli-ε-caprolactona (PCL) aprisionadas com óleo de *Nigella sativa* (NSO), variando de 200 a 400nm de acordo com a quantidade de óleo encapsulado, onde elas exibiam formas esféricas, uniformes e lisas.

7.3 Nanopartículas contendo FDCM de *F. platyphylla* apresenta atividade antileishmanial *in vitro*

A Tabela 16 apresenta os resultados da atividade das nanopartículas para a espécie de *L. amazonensis*. A atividade antiparasitária foi detectada de maneira dependente da concentração contra as formas promastigotas para a FDCM (IC_{50} = 253,1) e NPZ-FDCM (IC_{50} = 36,33), já para NPCL-FDCM não foram observadas atividade antiparasitária nas concentrações testadas (IC_{50} = >500 µg/mL).

Por outro lado, o efeito da FDCM e NPZ-FDCM sobre a viabilidade das formas amastigotas axênicas de *L. amazonensis* e macrófagos RAW 264.7, de maneira semelhante ao observado nas formas promastigotas, reduziu a viabilidade dessas formas parasitárias, com uma IC_{50} de 6,96 e 0,72 µg/mL, CC_{50} de 300,1 e >500 µg/mL e I.S. de 43,11 e 694,44, respectivamente (Tabela 16), mostrando que a nanopartícula de zeína é altamente eficaz e seletiva quando comparada com o medicamento de referência (pentamidina) e a fração sem está encapsulada. Além disso, nesse estudo, ambas as nanopartículas não foram tóxicas para macrófagos peritoneais de camundongos Balb/c.

Tabela 16. Concentração inibitória detectada nas formas promastigotas e amastigotas de *L. amazonensis* e macrófagos RAW 264.7 tratados com a PNT, FDCM, NPZ-FDCM, NPCL-FDCM.

Promastigotas <i>L. amazonensis</i>			
Composto	IC_{50} (µg/mL)	CC_{50} (µg/mL)	IS
PNT	4,0	178,0	44,5
FDCM	253,1	300,1	1,18
NPZ-FDCM	36,33	>500	13,76
NPCL-FDCM	>500	104,1	0,20
Amastigotas <i>L. amazonensis</i>			
PNT	5,0	178,0	35,6
FDCM	6,96	300,1	43,11
NPZ-FDCM	0,72	>500	694,44

PNT: pentamidina; FDCM: fração diclorometano; NPZ-FDCM: nanopartículas de zeína carregando FDCM; NPCL-FDCM: nanopartículas de PCL carregando FDCM; CC_{50} : concentração citotóxica a 50% dos macrófagos; IC_{50} : concentração inibitória para 50% dos parasitas; S.I.: índice de seletividade (CC_{50}/IC_{50}).

É importante destacar que o PCL é um polímero biodegradável e biocompatível aprovado pela Food and Drugs Administration (FDA) ideal para sistemas de liberação controlada de fármacos, pois apresenta baixa biodegradabilidade em relação a outros polímeros. Além disso apresenta boa solubilidade, baixo ponto de fusão (aproximadamente 59 - 64 °C) e pode ser completamente removido do corpo humano (Budama-Kilinc et al., 2018).

Apesar da NPCL-FDCM não apresentar boa atividade leishmanicida neste trabalho, não significa que não possa vir a apresentar em concentrações mais baixas que a utilizada aqui. De acordo com de Abreu e colaboradores (2016) nanopartículas poliméricas de PCL possuem como uma de suas principais características, uma liberação bastante lenta dos princípios ativos nelas incorporadas, chegando a liberar até por dias o ativo. Utilizando esse mesmo sistema estudaram o perfil de liberação *in vitro* de nanopartícula contendo nisina. A liberação foi lenta e constante durante 621h (20%), após 16h, apenas 2,6% da nisina foram liberados e após 114h (aproximadamente 5 dias) quase 7%.

Um outro fator que poderia ter inibido a atividade biológica da NPCL-FDCM talvez esteja relacionado com a quantidade da fração DCM incorporada na nanopartícula de PCL, e, conseqüentemente, com o tamanho das partículas poliméricas resultantes. Estes são dois fatores intimamente ligados que desempenham um papel crucial na liberação de medicamentos.

Segundo dados da literatura (Alexis et al., 2008; Li & Huang, 2008; Walkey et al., 2012; Cooper & Harirforoosh, 2014; Kamaly, Yameen & Farokhzad, 2016), a quantidade de fármaco que pode ser encapsulado em nanopartículas de PCL depende de vários fatores, incluindo a solubilidade no polímero, a concentração na formulação, a técnica de encapsulação utilizada e as condições de fabricação. Se a quantidade de princípio ativo farmacêutico atinge um certo limite, a superfície das nanopartículas pode ficar completamente saturada com moléculas do fármaco e isso pode criar uma barreira inicial para a liberação, pois as moléculas na superfície devem ser liberadas antes que as encapsuladas no interior das nanopartículas se torne acessível. Além disso, quanto mais fármaco estiver presente nas nanopartículas, mais lenta será a liberação, uma vez que a difusão deste para fora das nanopartículas é mais lenta e pode ser liberado gradualmente ao longo do tempo.

8. Conclusão

A FDCM contendo as brachydinas A, B e C apresenta atividade antileishmanial *in vitro* contra promastigotas de *L. infantum*, *L. amazonensis*, *L. braziliensis* e *L. mexicana* e contra amastigotas de *L. infantum*. Além disso, essa fração mostrou-se mais seletiva do que as drogas antileishmaniais de referência e diminuiu significativamente o número de macrófagos infectados e de amastigotas internalizados. Além disso, os ensaios *in vitro* sugerem que as brachydinas atuam rompendo as membranas celulares em vez de causar danos no DNA.

A análise computacional aplicada verificou dois modos de ligação da brachydina à enzima TIM, um localizado perto do sítio catalítico e o outro na interface do homodímero. Além disso, os resíduos Tyr103, Asn68 e Asp117 são cruciais para a estabilização do complexo e interações de ligações de hidrogênio com os compostos 1 e 2, os mais estáveis durante a simulação DM e os cálculos MMGBSA. Este estudo relata detalhes da ligação da brachydina à enzima TIM presente na *Leishmania*, um protozoário parasita com relevância médica. Os nossos resultados computacionais lançam uma nova luz sobre a dinâmica da TIM e os mecanismos de ação dos compostos de brachydina, contribuindo para o design de inibidores mais potentes da leishmaniose.

A análise de caracterização físico-química das nanopartículas contendo a FDCM da *Fridericia platyphylla* mostrou que ambas são estáveis ao longo do tempo, com boa eficiência de encapsulação como apresentado pelos ensaios de IV, CDE e MFA, tendo maior destaque a NPZ-FDCM. Isso sugere que essas nanopartículas têm potencial para serem usadas em aplicações de liberação controlada de compostos bioativos. No entanto, mais estudos são necessários para avaliar sua adequação para uso em produtos farmacêuticos, incluindo testes de liberação, ensaios *in vivo* e estudos de segurança.

Na ausência de um tratamento atual seguro e eficaz para a leishmaniose, os resultados aqui relatados indicam que a FDCM investigada é um possível candidato para o desenvolvimento de um novo sistema de tratamento para as leishmanioses a partir de uma fonte natural utilizando a nanotecnologia.

Referências

- Abamor, E. S., Tosyali, O. A., Bagirova, M., & Allahverdiyev, A. (2018). *Nigella sativa* oil entrapped polycaprolactone nanoparticles for leishmaniasis treatment. *IET Nanobiotechnology*, 12(8), 1018–1026. <https://doi.org/10.1049/iet-nbt.2018.5115>
- Ali, S., Khatri, Z., Oh, K. W., Kim, I.-S., & Kim, S. H. (2014). Zein/cellulose acetate hybrid nanofibers: Electrospinning and characterization. *Macromolecular Research*, 22(9), 971–977. <https://doi.org/10.1007/s13233-014-2136-4>
- Aires Fernandes, M., O. Eloy, J., Tavares Luiz, M., Ramos Junior, S. L., Borges, J. C., Rodríguez de la Fuente, L., Ortega-de San Luis, C., Maldonado Marchetti, J., Santos-Martinez, M. J., & Chorilli, M. (2021). Transferrin-functionalized liposomes for docetaxel delivery to prostate cancer cells. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 611, 125806. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2020.125806>
- Agrahari, V., & Hiremath, P. (2017). Challenges associated and approaches for successful translation of nanomedicines into commercial products. *Nanomedicine*, 12(8), 819–823. <https://doi.org/10.2217/nnm-2017-0039>
- Akbari, M., Oryan, A., & Hatam, G. (2017). Application of nanotechnology in treatment of leishmaniasis: A Review. *Acta Tropica*, 172, 86–90. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2017.04.029>
- Alcerito, T., Barbo, F. E., Negri, G., Santos, D. Y. A. C., Meda, C. I., Young, M. C. M., Chávez, D., & Blatt, C. T. T. (2002). Foliar epicuticular wax of *Arrabidaea brachypoda*: flavonoids and antifungal activity. *Biochemical Systematics and Ecology*, 30(7), 677–683. [https://doi.org/10.1016/S0305-1978\(01\)00149-1](https://doi.org/10.1016/S0305-1978(01)00149-1)
- Alexis, F., Pridgen, E., Molnar, L. K., & Farokhzad, O. C. (2008). Factors Affecting the Clearance and Biodistribution of Polymeric Nanoparticles. *Molecular Pharmaceutics*, 5(4), 505–515. <https://doi.org/10.1021/mp800051m>
- Alvarenga, A.T.; Bêdo, T.R.F.O.; Braguine, C.G.; Gonçalves, U.O.; Magalhães, L.G.; Rodrigues, V.; Gimenez, V.M.M.; Groppo, M.; Silva, M.L.A.; Cunha, W.R.; et al. Evaluation of *Cuspidaria pulchra* and its Isolated Compounds Against *Schistosoma mansoni* Adult Worms. *Int. J. Biotechnol. Wellness Ind.* 2012, 1, 122–127
- Alvarenga, T. A., Bertanha, C. S., de Oliveira, P. F., Tavares, D. C., Gimenez, V. M. M., Silva, M. L. A., Cunha, W. R., Januário, A. H., & Pauletti, P. M. (2015). Lipoxxygenase inhibitory activity of *Cuspidaria pulchra* and isolated compounds. *Natural Product Research*, 29(11), 1083–1086. <https://doi.org/10.1080/14786419.2014.981182>
- Alves, M. S. M., Mendes, P. C., Vieira, J. G. de P., Ozela, E. F., Barbosa, W. L. R., & Silva Júnior, J. O. C. (2010). Análise farmacognóstica das folhas de *Arrabidaea chica* (Humb. & Bonpl.) B. Verlt., Bignoniaceae. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 20(2), 215–221. <https://doi.org/10.1590/S0102-695X2010000200013>
- Anversa, L., Tiburcio, M. G. S., Richini-Pereira, V. B., & Ramirez, L. E. (2018). Human leishmaniasis in Brazil: A general review. *Revista Da Associação Médica Brasileira*, 64(3), 281–289. <https://doi.org/10.1590/1806-9282.64.03.281>

- Arvizo, R. R., Bhattacharyya, S., Kudgus, R. A., Giri, K., Bhattacharya, R., & Mukherjee, P. (2012). Intrinsic therapeutic applications of noble metal nanoparticles: past, present and future. *Chemical Society Reviews*, 41(7), 2943. <https://doi.org/10.1039/c2cs15355f>
- Barbosa, W. L. R., Pinto, L. do N., Quignard, E., Vieira, J. M. dos S., Silva Jr., J. O. C., & Albuquerque, S. (2008). *Arrabidaea chica* (HBK) Verlot: phytochemical approach, antifungal and trypanocidal activities. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 18(4), 544–548. <https://doi.org/10.1590/S0102-695X2008000400008>
- Beloqui, A., del Pozo-Rodríguez, A., Isla, A., Rodríguez-Gascón, A., & Solinís, M. Á. (2017). Nanostructured lipid carriers as oral delivery systems for poorly soluble drugs. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, 42, 144–154. <https://doi.org/10.1016/j.jddst.2017.06.013>
- Bezerra, J. L., Costa, G. C., Lopes, T. C., Carvalho, I. C. D. S., Patrício, F. J., Sousa, S. M., Amaral, F. M. M., Rebelo, J. M. M., Guerra, R. N. M., Ribeiro, M. N. S., & Nascimento, F. R. F. (2006). Avaliação da atividade leishmanicida in vitro de plantas medicinais. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 16, 631–637. <https://doi.org/10.1590/S0102-695X2006000500008>
- Bezerra, T. P. W., Bandeira, A. R. G., Lima, S. H. P. de, & Andrade, P. L. de. (2022). A nanotecnologia aplicada ao desenvolvimento de fármacos: revisão integrativa da literatura. *Research, Society and Development*, 11(14), e99111436115. <https://doi.org/10.33448/rsd-v11i14.36115>
- Bozzuto, G., & Molinari, A. (2015). Liposomes as nanomedical devices. *International Journal of Nanomedicine*, 975. <https://doi.org/10.2147/IJN.S68861>
- Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Ciência, T. e I. Estratégicos. D. de A. Farmacêutica. (2006). A fitoterapia no SUS e o Programa de Pesquisa de Plantas Medicinais da Central de Medicamentos. Ministério Da Saúde. https://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/fitoterapia_no_sus.pdf
- Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. (2011). Leishmaniose visceral: recomendações clínicas para a redução da letalidade. <https://www.gov.br/saude/pt-br/centrais-de-conteudo/publicacoes/svsa/leishmaniose/manual-de-leishmaniose-visceral-recomendacoes-clinicas-para-a-reducao-da-letalidade/view>
- BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. (2014). Manual de vigilância e controle da leishmaniose visceral. https://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/manual_vigilancia_controle_leishmanios_e_viscerai_1edicao.pdf
- Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. (2016, March 6). Dados Epidemiológicos Sinan-NET. Doenças e Agravos de Notificação - 2007 em diante. . <http://www.portalsinan.saude.gov.br/o-sinan>

Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância das Doenças Transmissíveis. (2017). Manual de vigilância da leishmaniose tegumentar [recurso eletrônico] (2 ed.). http://bvsmis.saude.gov.br/bvs/publicacoes/manual_vigilancia_leishmaniose_

Bruning, M. C. R., Mosegui, G. B. G., & Vianna, C. M. de M. (2012). A utilização da fitoterapia e de plantas medicinais em unidades básicas de saúde nos municípios de Cascavel e Foz do Iguaçu - Paraná: a visão dos profissionais de saúde. *Ciência & Saúde Coletiva*, 17(10), 2675–2685. <https://doi.org/10.1590/S1413-81232012001000017>

Brandão, G. C., Kroon, E. G., Santos, J. R. dos, Stehmann, J. R., Lombardi, J. A., & Oliveira, A. B. de. (2010). Antiviral activities of plants occurring in the state of Minas Gerais, Brazil: Part 2. Screening Bignoniaceae species. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 20(5), 742–750. <https://doi.org/10.1590/S0102-695X2010005000035>

Brandão, G., Kroon, E., Souza, D., Filho, J., & Oliveira, A. (2013). Chemistry and Antiviral Activity of *Arrabidaea pulchra* (Bignoniaceae). *Molecules*, 18(8), 9919–9932. <https://doi.org/10.3390/molecules18089919>

Budama-Kilinc, Y., Cakir-Koc, R., Kecel-Gunduz, S., Zorlu, T., Kokcu, Y., Bicak, B., Karavelioglu, Z., & Ozel, A. E. (2018). Papain Loaded Poly(ϵ -Caprolactone) Nanoparticles: In-silico and In-Vitro Studies. *Journal of Fluorescence*, 28(5), 1127–1142. <https://doi.org/10.1007/s10895-018-2276-6>

Campolina, T. B., Villegas, L. E. M., Monteiro, C. C., Pimenta, P. F. P., & Secundino, N. F. C. (2020). Tripartite interactions: Leishmania, microbiota and Lutzomyia longipalpis. *PLOS Neglected Tropical Diseases*, 14(10), e0008666. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0008666>

Campos, V. E. B. de, Ricci-Júnior, E., & Mansur, C. R. E. (2012). Nanoemulsions as Delivery Systems for Lipophilic Drugs. *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*, 12(3), 2881–2890. <https://doi.org/10.1166/jnn.2012.5690>

Carneiro, G., Aguiar, M. G., Fernandes, A. P., & Ferreira, L. A. M. (2012). Drug delivery systems for the topical treatment of cutaneous leishmaniasis. *Expert Opinion on Drug Delivery*, 9(9), 1083–1097. <https://doi.org/10.1517/17425247.2012.701204>

Carneiro, S. P., & dos Santos, O. D. H. (2020). Nanostructured lipid carrier-based drug delivery systems for tuberculosis treatment. In *Nanotechnology Based Approaches for Tuberculosis Treatment* (pp. 193–205). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-819811-7.00012-6>

Carvalho, J. de P., Assis, T. M. de, Simões, T. C., & Cota, G. (2021). Estimating direct costs of the treatment for mucosal leishmaniasis in Brazil. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.*, 54, 1-9. <https://doi.org/10.1590/0037-8682-0454-2020>

Carvalho, Y., Shanmugam, S., Batista, M. S., Serafini, M. R., Araújo, A. A. D. S., & Quintans Júnior, L. J. (2020). Pharmaceutical agents for treatment of leishmaniasis: a patent landscape. *Expert Opin. Ther. Pat.*, 30(8), 633–641. doi: 10.1080/13543776.2020.1789100.

- Casteleijn, M. G., Alahuhta, M., Groebel, K., El-Sayed, I., Augustyns, K., Lambeir, A.-M., Neubauer, P., & Wierenga, R. K. (2006). Functional Role of the Conserved Active Site Proline of Triosephosphate Isomerase. *Biochem.*, 45(51), 15483–15494. <https://doi.org/10.1021/bi061683j>
- Case, D. A., Cheatham, T. E., Darden, T., Gohlke, H., Luo, R., Merz, K. M., Onufriev, A., Simmerling, C., Wang, B., & Woods, R. J. (2005a). The Amber biomolecular simulation programs. *J. Comput. Chem.*, 26(16), 1668–1688. doi: 10.1002/jcc.20290.
- Castelo Branco, P. V., Soares, R.-E. P., de Jesus, L. C. L., Moreira, V. R., Alves, H. J., de Castro Belfort, M. R., Silva, V. L. M., & Ferreira Pereira, S. R. (2016). The antileishmanial drug miltefosine (Impavido ®) causes oxidation of DNA bases, apoptosis, and necrosis in mammalian cells. *Mutat. Res. - Genet. Toxicol. Environ. Mutagen.*, 806, 34–39. DOI:10.1016/j.mrgentox.2016.06.007
- Castelo-Branco, P. V., Alves, H. J., Pontes, R. L., Maciel-Silva, V. L., & Ferreira Pereira, S. R. (2019). Ascorbic acid reduces the genetic damage caused by miltefosine (hexadecylphosphocholine) in animals infected by *Leishmania (Leishmania) infantum* without decreasing its antileishmanial activity. *Int. J. Parasitol.: Drugs Drug Resist.*, 9, 8–15. doi: 10.1016/j.ijpddr.2018.12.002.
- Chen, S., Xu, C., Mao, L., Liu, F., Sun, C., Dai, L., & Gao, Y. (2018). Fabrication and characterization of binary composite nanoparticles between zein and shellac by anti-solvent co-precipitation. *Food and Bioproducts Processing*, 107, 88–96. <https://doi.org/10.1016/j.fbp.2017.11.003>
- Chentharama, D., Subramaniam, S., Ramakrishnan, S. G., Krishnaswamy, S., Essa, M. M., Lin, F.-H., & Qoronfleh, M. W. (2019). Therapeutic efficacy of nanoparticles and routes of administration. *Biomaterials Research*, 23(1), 20. <https://doi.org/10.1186/s40824-019-0166-x>
- Cheuka, P., Mayoka, G., Mutai, P., & Chibale, K. (2016). The Role of Natural Products in Drug Discovery and Development against Neglected Tropical Diseases. *Molecules*, 22(1), 58. <https://doi.org/10.3390/molecules22010058>
- Choi, Y. H., & Han, H.-K. (2018). Nanomedicines: current status and future perspectives in aspect of drug delivery and pharmacokinetics. *Journal of Pharmaceutical Investigation*, 48(1), 43–60. <https://doi.org/10.1007/s40005-017-0370-4>
- Chuacharoen, T., & Sabliov, C. M. (2016). Stability and controlled release of lutein loaded in zein nanoparticles with and without lecithin and pluronic F127 surfactants. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 503, 11–18. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2016.04.038>
- Comandolli-Wyrepkowski, C. D., Paz, A. da C., Jensen, B. B., & Franco, A. M. R. (2020). Pharmacological aspects of drug therapy used for cutaneous leishmaniasis: a literature review. *Electron. J. Collec. Health*, 12(8), 1–10. <https://doi.org/10.25248/reas.e3352.2020>

- Cooper, D. L., & Harirforoosh, S. (2014). Effect of Formulation Variables on Preparation of Celecoxib Loaded Polylactide-Co-Glycolide Nanoparticles. *PLoS ONE*, 9(12), e113558. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0113558>
- Cortes, S., Bruno de Sousa, C., Morais, T., Lago, J., & Campino, L. (2020). Potential of the natural products against leishmaniasis in Old World - a review of in-vitro studies. *Pathogens and Global Health*, 114(4), 170–182. <https://doi.org/10.1080/20477724.2020.1754655>
- Dai, R. Y., You, S. Y., Lu, L. M., Liu, Q., Li, Z. X., Wei, L., Huang, X. G., & Yang, Z. Y. (2017). High blades spreadability of chlorpyrifos microcapsules prepared with polysiloxane sodium carboxylate/sodium carboxymethylcellulose/gelatin via complex coacervation. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 530, 13–19. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2017.06.057>
- da Costa, R. S., Negrão, C. A. B., Camelo, S. R. P., Ribeiro-Costa, R. M., Barbosa, W. L. R., da Costa, C. E. F., & Silva Júnior, J. O. C. (2013). Investigation of thermal behavior of *Heliotropium indicum* L. lyophilized extract by TG and DSC. *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry*, 111(3), 1959–1964. <https://doi.org/10.1007/s10973-011-2088-2>
- da Rocha, C. Q., Vilela, F. C., Cavalcante, G. P., Santa-Cecília, F. v., Santos-e-Silva, L., dos Santos, M. H., & Giusti-Paiva, A. (2011). Anti-inflammatory and antinociceptive effects of *Arrabidaea brachypoda* (DC.) Bureau roots. *Journal of Ethnopharmacology*, 133(2), 396–401. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2010.10.009>
- da Rocha, C. Q., Queiroz, E. F., Meira, C. S., Moreira, D. R. M., Soares, M. B. P., Marcourt, L., Vilegas, W., & Wolfender, J.-L. (2014). Dimeric Flavonoids from *Arrabidaea brachypoda* and Assessment of Their Anti- *Trypanosoma cruzi* Activity. *Journal of Natural Products*, 77(6), 1345–1350. <https://doi.org/10.1021/np401060j>
- da Rocha, C. Q., Vilela, F. C., Santa-Cecília, F. v., Cavalcante, G. P., Vilegas, W., Giusti-Paiva, A., & dos Santos, M. H. (2015). Oleanane-type triterpenoid: An anti-inflammatory compound of the roots *Arrabidaea brachypoda*. *Rer. bras farmacogn.*, 25(3), 228–232. <https://doi.org/10.1016/j.bjp.2015.03.005>
- da Silva, N. P., Carmo Rapozo Lavinas Pereira, E. do, Duarte, L. M., de Oliveira Freitas, J. C., de Almeida, C. G., da Silva, T. P., Melo, R. C. N., Morais Apolônio, A. C., de Oliveira, M. A. L., de Mello Brandão, H., Pittella, F., Fabri, R. L., Tavares, G. D., & de Faria Pinto, P. (2020). Improved anti-*Cutibacterium acnes* activity of tea tree oil-loaded chitosan-poly(ϵ -caprolactone) core-shell nanocapsules. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 196, 111371. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2020.111371>
- de Abreu, L. C. L., Todaro, V., Sathler, P. C., da Silva, L. C. R. P., do Carmo, F. A., Costa, C. M., Toma, H. K., Castro, H. C., Rodrigues, C. R., de Sousa, V. P., & Cabral, L. M. (2016). Development and Characterization of Nisin Nanoparticles as Potential Alternative for the Recurrent Vaginal Candidiasis Treatment. *AAPS PharmSciTech*, 17(6), 1421–1427. <https://doi.org/10.1208/s12249-016-0477-3>
- de Carvalho, R. F., Ribeiro, I. F., Miranda-Vilela, A. L., de Souza Filho, J., Martins, O. P., de Oliveira Cintra e Silva, D., Tedesco, A. C., Lacava, Z. G. M., Bão, S. N., &

Sampaio, R. N. R. (2013). Leishmanicidal activity of amphotericin B encapsulated in PLGA–DMSA nanoparticles to treat cutaneous leishmaniasis in C57BL/6 mice. *Experimental Parasitology*, 135(2), 217–222. <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2013.07.008>

de Lima, C. A., Cubero, M. C. Z., Franco, Y. E. M., Rodrigues, C. D. P., do Nascimento, J. R., Vendramini-Costa, D. B., Sciani, J. M., da Rocha, C. Q., & Longato, G. B. (2022). Antiproliferative Activity of Two Unusual Dimeric Flavonoids, Brachyidin E and Brachyidin F, Isolated from *Fridericia platyphylla* (Cham.) L.G.Lohmann: In Vitro and Molecular Docking Evaluation. *BioMed Research International*, 2022, 1–12. <https://doi.org/10.1155/2022/3319203>

de Mello, T. F. P., Bitencourt, H. R., Pedroso, R. B., Aristides, S. M. A., Lonardoni, M. V. C., & Silveira, T. G. V. (2014). Leishmanicidal activity of synthetic chalcones in *Leishmania (Viannia) braziliensis*. *Exp. Parasitol.*, 136, 27–34. doi: 10.1016/j.exppara.2013.11.003.

de Sousa Andrade, L. M., de Oliveira, A. B. M., Leal, A. L. A. B., de Alcântara Oliveira, F. A., Portela, A. L., de Sousa Lima Neto, J., de Siqueira-Júnior, J. P., Kaatz, G. W., da Rocha, C. Q., & Barreto, H. M. (2020). Antimicrobial activity and inhibition of the NorA efflux pump of *Staphylococcus aureus* by extract and isolated compounds from *Arrabidaea brachypoda*. *Microbial Pathogenesis*, 140, 103935. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2019.103935>

Dias, B., Ribeiro, E., Gonçalves, R., Oliveira, D., Ferreira, T., & Silva, B. (2021). A nanotecnologia no brasil e o desenvolvimento de produtos com atividade antimicrobiana. *Química Nova*. <https://doi.org/10.21577/0100-4042.20170743>

Dias Caboclo, E. K., Rodrigues de Sousa, A., Berça Santos, J., Souza Castro, L., Oliveira Bordin, A., & Fávero Lisboa, H. C. (2022). Fitoterápicos e plantas medicinais na prática dos profissionais de saúde em unidades de Estratégia Saúde da Família. *Revista de Ciências Médicas e Biológicas*, 21(2), 211–217. <https://doi.org/10.9771/cmbio.v21i2.47704>

do Nascimento, J. R., de Jesus Alves Miranda, A., Vieira, F. C., Rodrigues, C. D. P., Vasconcelos, L. N., Filho, J. L. P., Lopes, A. C. C. B., Tangerina, M. M. P., Vilegas, W., & da Rocha, C. Q. (2022). A Review of the Phytochemistry and Pharmacological Properties of the Genus *Arrabidaea*. *Pharmaceuticals*, 15(6), 658. <https://doi.org/10.3390/ph15060658>

do Nascimento, T. G., da Silva, P. F., Azevedo, L. F., da Rocha, L. G., de Moraes Porto, I. C. C., Lima e Moura, T. F. A., Basílio-Júnior, I. D., Grillo, L. A. M., Dornelas, C. B., Fonseca, E. J. da S., de Jesus Oliveira, E., Zhang, A. T., & Watson, D. G. (2016). Polymeric Nanoparticles of Brazilian Red Propolis Extract: Preparation, Characterization, Antioxidant and Leishmanicidal Activity. *Nanoscale Research Letters*, 11(1), 301. <https://doi.org/10.1186/s11671-016-1517-3>

Dorlo, T. P. C., Balasegaram, M., Beijnen, J. H., & de Vries, P. J. (2012). Miltefosine: a review of its pharmacology and therapeutic efficacy in the treatment of leishmaniasis.

Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 67(11), 2576–2597.
<https://doi.org/10.1093/jac/dks275>

dos Santos, D. B., Lemos, J. A., Miranda, S. E. M., di Filippo, L. D., Duarte, J. L., Ferreira, L. A. M., Barros, A. L. B., & Oliveira, A. E. M. F. M. (2022). Current Applications of Plant-Based Drug Delivery Nano Systems for Leishmaniasis Treatment. *Pharmaceutics*, 14(11), 2339. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics14112339>

Egito, L. C. M., Batistuzzo de Medeiros, S. R., Medeiros, M. G., Price, J. C., & Egito, E. S. T. (2004). Evaluation of the relationship of the molecular aggregation state of amphotericin B in medium to its genotoxic potential. *J. Pharm. Sci.*, 93(6), 1557–1565. doi: 10.1002/jps.20038.

Ferreira, L. L. G., & Andricopulo, A. D. (2019). Drugs and vaccines in the 21st century for neglected diseases. *The Lancet Infectious Diseases*, 19(2), 125–127. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(19\)30005-2](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(19)30005-2)

Fiser, A., & Šali, A. (2003). Modeller: Generation and Refinement of Homology-Based Protein Structure Models, 374, pp.461–491. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(03\)74020-8](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(03)74020-8)

França, D. C., Morais, D. D., Bezerra, E. B., Araújo, E. M., & Wellen, R. M. R. (2018). Photodegradation Mechanisms on Poly(ε-caprolactone) (PCL). *Materials Research*, 21(5). <https://doi.org/10.1590/1980-5373-mr-2017-0837>

Gayathri, P., Banerjee, M., Vijayalakshmi, A., Balaram, H., Balaram, P., & Murthy, M. R. N. (2009). Biochemical and structural characterization of residue 96 mutants of *Plasmodium falciparum* triosephosphate isomerase: active-site loop conformation, hydration and identification of a dimer-interface ligand-binding site. *Acta Crystallogr.*, 65(8), 847–857. DOI:10.1107/S0907444909018666

Gershkovich, P., Wasan, E. K., Lin, M., Sivak, O., Leon, C. G., Clement, J. G., & Wasan, K. M. (2009). Pharmacokinetics and biodistribution of amphotericin B in rats following oral administration in a novel lipid-based formulation. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 64(1), 101–108. <https://doi.org/10.1093/jac/dkp140>

Ghasemiyeh, P., & Mohammadi-Samani, S. (2018). Solid lipid nanoparticles and nanostructured lipid carriers as novel drug delivery systems: applications, advantages and disadvantages. *Research in Pharmaceutical Sciences*, 13(4), 288. <https://doi.org/10.4103/1735-5362.235156>

Ghodsian, S., Taghipour, N., Deravi, N., Behniafar, H., & Lasjerdi, Z. (2020). Recent researches in effective antileishmanial herbal compounds: narrative review. *Parasitology Research*, 119(12), 3929–3946. <https://doi.org/10.1007/s00436-020-06787-0>

González, B., Suárez-Roca, H., Bravo, A., Salas-Auvert, R., & Avila, D. (2000). Chemical Composition And Biological Activity Of Extracts From *Arrabidaea Bilabiata*. *Pharmaceutical Biology*, 38(4), 287–290. [https://doi.org/10.1076/1388-0209\(200009\)3841-AFT287](https://doi.org/10.1076/1388-0209(200009)3841-AFT287)

- González-Morales, L. D., Moreno-Rodríguez, A., Vázquez-Jiménez, L. K., Delgado-Maldonado, T., Juárez-Saldivar, A., Ortiz-Pérez, E., Paz-Gonzalez, A. D., Lara-Ramírez, E. E., Yépez-Mulia, L., Meza, P., & Rivera, G. (2023). Triose Phosphate Isomerase Structure-Based Virtual Screening and In Vitro Biological Activity of Natural Products as *Leishmania mexicana* Inhibitors. *Pharmaceutics*, 15(8), 2046. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics15082046>
- Greenwood, R. (2003). Review of the measurement of zeta potentials in concentrated aqueous suspensions using electroacoustics. *Advances in Colloid and Interface Science*, 106(1–3), 55–81. [https://doi.org/10.1016/S0001-8686\(03\)00105-2](https://doi.org/10.1016/S0001-8686(03)00105-2)
- Gupta, A., Eral, H. B., Hatton, T. A., & Doyle, P. S. (2016). Nanoemulsions: formation, properties and applications. *Soft Matter*, 12(11), 2826–2841. <https://doi.org/10.1039/C5SM02958A>
- Hasenclever, L., Paranhos, J., Costa, C. R., Cunha, G., & Vieira, D. (2017). A indústria de fitoterápicos brasileira: desafios e oportunidades. *Ciência & Saúde Coletiva*, 22(8), 2559–2569. <https://doi.org/10.1590/1413-81232017228.29422016>
- Hu, K., & McClements, D. J. (2014). Fabrication of surfactant-stabilized zein nanoparticles: A pH modulated antisolvent precipitation method. *Food Research International*, 64, 329–335. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2014.07.004>
- Iravani, S. (2011). Green synthesis of metal nanoparticles using plants. *Green Chemistry*, 13(10), 2638. <https://doi.org/10.1039/c1gc15386b>
- Jain, K., & Jain, N. K. (2013). Novel therapeutic strategies for treatment of visceral leishmaniasis. *Drug Discovery Today*, 18(23–24), 1272–1281. <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2013.08.005>
- Jaiswal, P., Gidwani, B., & Vyas, A. (2016). Nanostructured lipid carriers and their current application in targeted drug delivery. *Artificial Cells, Nanomedicine, and Biotechnology*, 44(1), 27–40. <https://doi.org/10.3109/21691401.2014.909822>
- Jansook, P., Fülöp, Z., & Ritthidej, G. C. (2019). Amphotericin B loaded solid lipid nanoparticles (SLNs) and nanostructured lipid carrier (NLCs): physicochemical and solid-solution state characterizations. *Drug Development and Industrial Pharmacy*, 45(4), 560–567. <https://doi.org/10.1080/03639045.2019.1569023>
- Jiang, L. Q., Wang, T. Y., Webster, T. J., Duan, H.-J., Qiu, J. Y., Zhao, Z. M., Yin, X.-X., & Zheng, C. L. (2017). Intracellular disposition of chitosan nanoparticles in macrophages: intracellular uptake, exocytosis, and intercellular transport. *International Journal of Nanomedicine*, Volume 12, 6383–6398. <https://doi.org/10.2147/IJN.S142060>
- Juárez-Saldivar, A., Barbosa-Cabrera, E., Lara-Ramírez, E. E., Paz-González, A. D., Martínez-Vázquez, A. v., Bocanegra-García, V., Palos, I., Campillo, N. E., & Rivera, G. (2021). Virtual Screening of FDA-Approved Drugs against Triose Phosphate Isomerase from *Entamoeba histolytica* and *Giardia lamblia* Identifies Inhibitors of Their Trophozoite Growth Phase. *Int. J. Mol. Sci.*, 22(11), 5943. <https://doi.org/10.3390/ijms22115943>

- Juárez-Saldivar, A., Schroeder, M., Salentin, S., Haupt, V. J., Saavedra, E., Vázquez, C., Reyes-Espinosa, F., Herrera-Mayorga, V., Villalobos-Rocha, J. C., García-Pérez, C. A., Campillo, N. E., & Rivera, G. (2020). Computational Drug Repositioning for Chagas Disease Using Protein-Ligand Interaction Profiling. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(12), 4270. <https://doi.org/10.3390/ijms21124270>
- Jurrus, E., Engel, D., Star, K., Monson, K., Brandi, J., Felberg, L. E., Brookes, D. H., Wilson, L., Chen, J., Liles, K., Chun, M., Li, P., Gohara, D. W., Dolinsky, T., Konecny, R., Koes, D. R., Nielsen, J. E., Head-Gordon, T., Geng, W., Baker, N. A. (2018). Improvements to the APBS biomolecular solvation software suite. *Protein Sci.*, 27(1), 112–128. doi: 10.1002/pro.3280.
- Kamaly, N., Yameen, B., Wu, J., & Farokhzad, O. C. (2016). Degradable Controlled-Release Polymers and Polymeric Nanoparticles: Mechanisms of Controlling Drug Release. *Chemical Reviews*, 116(4), 2602–2663. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.5b00346>
- Katebi, A. R., & Jernigan, R. L. (2014). The critical role of the loops of triosephosphate isomerase for its oligomerization, dynamics, and functionality. *Protein Sci.*, 23(2), 213–228. <https://doi.org/10.1002/pro.2407>
- Kayser, O., Kiderlen, A. F., & Croft, S. L. (2003). Natural products as antiparasitic drugs. *Parasitology Research*, 90(0), S55–S62. <https://doi.org/10.1007/s00436-002-0768-3>
- Khan, S. A. (2020). Metal nanoparticles toxicity: role of physicochemical aspects. In *Metal Nanoparticles for Drug Delivery and Diagnostic Applications* (pp. 1–11). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-816960-5.00001-X>
- Kim, E.-M., & Jeong, H.-J. (2021). Liposomes: Biomedical Applications. *Chonnam Medical Journal*, 57(1), 27. <https://doi.org/10.4068/cmj.2021.57.1.27>
- Krieger, E.; Nabuurs, S.B.; Vriend, G., 2003. Homology Modeling. In *Structural Bioinformatics* John Wiley & Sons, Inc., pp. 509–523
- Kumar, M., Bishnoi, R. S., Shukla, A. K., & Jain, C. P. (2019). Techniques for Formulation of Nanoemulsion Drug Delivery System: A Review. *Preventive Nutrition and Food Science*, 24(3), 225–234. <https://doi.org/10.3746/pnf.2019.24.3.225>
- Kumar, R., Sahoo, G. C., Pandey, K., Das, V., & Das, P. (2015). Study the effects of PLGA-PEG encapsulated Amphotericin B nanoparticle drug delivery system against *Leishmania donovani*. *Drug Delivery*, 22(3), 383–388. <https://doi.org/10.3109/10717544.2014.891271>
- Laskowski, R. A., Jabłońska, J., Pravda, L., Vařeková, R. S., & Thornton, J. M. (2018). PDBsum: Structural summaries of PDB entries. *Protein Sci.*, 27(1), 129–134. doi: 10.1002/pro.3289.
- Leite, J. P. v., Oliveira, A. B., Lombardi, J. A., Filho, J. D. S., & Chiari, E. (2006). Trypanocidal Activity of Triterpenes from *Arrabidaea triplinervia* and Derivatives. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 29(11), 2307–2309. <https://doi.org/10.1248/bpb.29.2307>

- Li, S.-D., & Huang, L. (2008). Pharmacokinetics and Biodistribution of Nanoparticles. *Molecular Pharmaceutics*, 5(4), 496–504. <https://doi.org/10.1021/mp800049w>
- Liao, Q., Kulkarni, Y., Sengupta, U., Petrović, D., Mulholland, A. J., van der Kamp, M. W., Strodel, B., & Kamerlin, S. C. L. (2018). Loop Motion in Triosephosphate Isomerase Is Not a Simple Open and Shut Case. *J. Am. Chem. Soc.*, 140(46), 15889–15903. <https://doi.org/10.1021/jacs.8b09378>
- Lima, M. I. S., Arruda, V. O., Alves, E. V. C., de Azevedo, A. P. S., Monteiro, S. G., & Pereira, S. R. F. (2010). Genotoxic effects of the antileishmanial drug glucantime®. *Arch. Toxicol.*, 84(3), 227–232. doi: 10.1007/s00204-009-0485-0.
- Lima, P. C., dos Santos, M. G., Calabrese, K. D. S., Abreu Silva, A. L., & Almeida, F. (2015). Avaliação da capacidade leishmanicida de espécies vegetais do cerrado. *Rer. Patolog. Trop.*, 44(1), 45-55. DOI:10.5216/rpt.v44i1.34800
- Luna-Herrera, J., Pérez-Martínez, D. E., Barradas-Hernández, V. M., & Zenteno-Cuevas, R. (2021). Nanopartículas como transportadores de fármacos: una herramienta prometedora contra la tuberculosis. *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Pública*, 38(1), 143–152. <https://doi.org/10.17843/rpmesp.2021.381.6156>
- Luo, Y., & Wang, Q. (2014). Zein-based micro- and nano-particles for drug and nutrient delivery: A review. *Journal of Applied Polymer Science*, 131(16), n/a-n/a. <https://doi.org/10.1002/app.40696>
- Maciel-Silva, V. L., da Rocha, C. Q., Alencar, L. M. R., Castelo-Branco, P. V., Sousa, I. H. de, Azevedo-Santos, A. P., Vale, A. A. M., Monteiro, S. G., Soares, R.-E. P., Guimarães, S. J. A., Nascimento, J. R. do, & Pereira, S. R. F. (2023). Unusual dimeric flavonoids (brachydins) induce ultrastructural membrane alterations associated with antitumor activity in cancer cell lines. *Drug and Chemical Toxicology*, 46(4), 665–676. <https://doi.org/10.1080/01480545.2022.2080217>
- Makwali, J. A., Wanja, F. M. E., Ingonga, J., & Anjili, C. O. (2015). In vitro Studies on the Antileishmanial Activity of Herbicides and Plant Extracts Against *Leishmania major* Parasites. *Res. J. Medicinal Plant*, 9(3), 90–104. DOI:10.3923/rjmp.2015.90.104
- Malak, N., Alotaibi, B. S., Khan, A., Khan, A., Ullah, S., Nasreen, N., Niaz, S., & Chen, C.-C. (2023). Density Functional Theory Calculations and Molecular Docking Analyses of Flavonoids for Their Possible Application against the Acetylcholinesterase and Triose-Phosphate Isomerase Proteins of *Rhipicephalus microplus*. *Molecules*, 28(8), 3606. <https://doi.org/10.3390/molecules28083606>
- Marcato, P. D. D. (2009). Preparação, caracterização e aplicações em fármacos e cosméticos de nanopartículas lipídicas sólidas. *Revista Eletrônica de Farmácia*, 6(2). <https://doi.org/10.5216/ref.v6i2.6545>
- Mark, P., & Nilsson, L. (2001). Structure and Dynamics of the TIP3P, SPC, and SPC/E Water Models at 298 K. *J. Phys. Chem. A*, 105(43), 9954–9960. <https://doi.org/10.1021/jp003020w>

Martin, F.; Hay, A.E.; Cressend, D.; Reist, M.; Vivas, L.; Gupta, M.P.; Carrupt, P.A.; Hostettmann, K. Antioxidant C-glucosylxanthenes from the leaves of *Arrabidaea patellifera*. *J. Nat. Prod.* 2008, 71, 1887–1890.

Mehnert, W., & Mäder, K. (2012). Solid lipid nanoparticles. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 64, 83–101. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2012.09.021>

Melo, V. F. de, Coelho, J. L. G., Sousa, C. M. S., Fernandes, E. A. M. D., Brito, R. T. B. E. de, & Santana, W. J. de. (2020). PHARMACOLOGICAL APPLICATIONS OF CONTROLLED RELEASE DRUGS. *Amadeus International Multidisciplinary Journal*, 5(9), 124–128. <https://doi.org/10.14295/aimj.v5i9.132>

Mishra, P. R., Shaal, L. al, Müller, R. H., & Keck, C. M. (2009). Production and characterization of Hesperetin nanosuspensions for dermal delivery. *International Journal of Pharmaceutics*, 371(1–2), 182–189. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2008.12.030>

Mistro, S., Gomes, B., Rosa, L., Miranda, L., Camargo, M., & Badaró, R. (2017). Cost-effectiveness of liposomal amphotericin B in hospitalised patients with mucocutaneous leishmaniasis. *Trop. Med. Int. Health*, 22(12), 1569–1578. doi: 10.1111/tmi.12996

Moreira, V. R., de Jesus, L. C. L., Soares, R.-E. P., Silva, L. D. M., Pinto, B. A. S., Melo, M. N., Paes, A. M. de A., & Pereira, S. R. F. (2017). Meglumine Antimoniate (Glucantime) Causes Oxidative Stress-Derived DNA Damage in BALB/c Mice Infected by *Leishmania (Leishmania) infantum*. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 61(6), 1-10. doi: 10.1128/AAC.02360-16.

Mohamed, A., Gordon, S. H., & Biresaw, G. (2007). Polycaprolactone/polystyrene bioblends characterized by thermogravimetry, modulated differential scanning calorimetry and infrared photoacoustic spectroscopy. *Polymer Degradation and Stability*, 92(7), 1177–1185. <https://doi.org/10.1016/j.polymdegradstab.2007.04.012>

Mohanraj, V. J., & Chen, Y. (2007). Nanoparticles - A review. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*, 5(1). <https://doi.org/10.4314/tjpr.v5i1.14634>

Mosqueira, V. C. F., Legrand, P., Pinto-Alphandary, H., Puisieux, F., & Barratt, G. (2000). Poly(D,L-Lactide) Nanocapsules Prepared by a Solvent Displacement Process: Influence of the Composition on Physicochemical and Structural Properties. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 89(5), 614–626. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1520-6017\(200005\)89:5<614::AID-JPS7>3.0.CO;2-7](https://doi.org/10.1002/(SICI)1520-6017(200005)89:5<614::AID-JPS7>3.0.CO;2-7)

Morizot, G., Jouffroy, R., Faye, A., Chabert, P., Belhouari, K., Calin, R., Charlier, C., Mialhes, P., Siriez, J.-Y., Mouri, O., Yera, H., Gilquin, J., Tubiana, R., Lanternier, F., Mamzer, M.-F., Legendre, C., Peyramond, D., Caumes, E., Lortholary, O., & Buffet, P. (2016). Antimony to Cure Visceral Leishmaniasis Unresponsive to Liposomal Amphotericin B. *PLoS Negl. Trop. Dis.*, 10(1), 1-6. doi: 10.1371/journal.pntd.0004304

Mosmann, T. (1983). Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immunol. Methods*, 65(1–2), 55–63. DOI: 10.1016/0022-1759(83)90303-4

Myers, T. D., & Palladino, M. J. (2023). Newly discovered roles of triosephosphate isomerase including functions within the nucleus. *Mol. Medicine*, 29(1), 18. <https://doi.org/10.1186/s10020-023-00612-x>

Nascimento, M. H. M., Franco, M. K. K. D., Yokaichya, F., de Paula, E., Lombello, C. B., & de Araujo, D. R. (2018). Hyaluronic acid in Pluronic F-127/F-108 hydrogels for postoperative pain in arthroplasties: Influence on physico-chemical properties and structural requirements for sustained drug-release. *International Journal of Biological Macromolecules*, 111, 1245–1254. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.01.064>

Neuenschwander, A.; Rocha, V.P.C.; Bastos, T.M.; Marcourt, L.; Morin, H.; Rocha, C.Q.; Grimaldi, G.B.; de Sousa, K.A.F.; Borges, J.N.; Rivara-Minten, E.; et al. Production of highly active antiparasitic compounds from the controlled halogenation of the Arrabidaea brachypoda crude plant extract. *J. Nat. Prod.* 2020, 83, 2631–2640.

Nunes, H. L., Tuttis, K., Serpeloni, J. M., Nascimento, J. R. do, da Rocha, C. Q., Silva, V. A. O., Lengert, A. van H., Reis, R. M., & de Syllos Cólus, I. M. (2020). Characterization of the in vitro cytotoxic effects of brachydins isolated from *Fridericia platyphylla* in a prostate cancer cell line. *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A*, 83(15–16), 547–558. <https://doi.org/10.1080/15287394.2020.1784339>

Olivares-Illana, V., Rodríguez-Romero, A., Becker, I., Berzunza, M., García, J., Pérez-Montfort, R., Cabrera, N., López-Calahorra, F., de Gómez-Puyou, M. T., & Gómez-Puyou, A. (2007). Perturbation of the Dimer Interface of Triosephosphate Isomerase and its Effect on *Trypanosoma cruzi*. *PLoS Negl. Trop. Dis.*, 1(1), e1. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0000001>

OPAS. (2019, March). LEISHMANIOSES. Informe Epidemiológico das Américas. Informe de Leishmanioses No 7. <https://iris.paho.org/bitstream/handle/10665.2/50505/2019-cde-leish-informe-epi-das-americas.pdf>

OPAS. (2022). Diretrizes para o tratamento das leishmanioses na Região das Américas. Segunda edição. Pan American Health Organization. <https://doi.org/10.37774/9789275725030>

Ordóñez-Gutiérrez, L., Espada-Fernández, R., Dea-Ayuela, M. A., Torrado, J. J., Bolás-Fernandez, F., & Alunda, J. M. (2007). In vitro effect of new formulations of amphotericin B on amastigote and promastigote forms of *Leishmania infantum*. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 30(4), 325–329. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2007.05.013>

Ortega, V., Giorgio, S., & de Paula, E. (2017). Liposomal formulations in the pharmacological treatment of leishmaniasis: a review. *Journal of Liposome Research*, 27(3), 234–248. <https://doi.org/10.1080/08982104.2017.1376682>

PAIVA, D. L., LAMPMAN, G. M., KRIZ, G. S., & VYVYAN, J. R. (2012). Introdução à Espectroscopia. Cengage Learning.

Paliwal, R., Paliwal, S. R., Kenwat, R., Kurmi, B. das, & Sahu, M. K. (2020). Solid lipid nanoparticles: a review on recent perspectives and patents. *Expert Opinion on*

Pauletti, P.M.; Bolzani, V.S.; Young, M.C.M. Constituintes químicos de *Arrabidaea samydoides* (Bignoniaceae). *Quim. Nova* 2003, 26, 641–643.

Pauletti, P. M., Castro-Gamboa, I., Siqueira Silva, D. H., Young, M. C. M., Tomazela, D. M., Eberlin, M. N., & da Silva Bolzani, V. (2003). New Antioxidant C - Glucosylxanthenes from the Stems of *Arrabidaea samydoides*. *Journal of Natural Products*, 66(10), 1384–1387. <https://doi.org/10.1021/np030100t>

Pereira, I., Rocha, C. Q. da; Rosa, I. A., Mendonça, A. T., Vilegas, W., Sacramento, L. V. S. do; Marques, M. J. (2012). Leishmanicidal activity of different parts from *Arrabidaea brachypoda* (DC.) Bureau (Bignoniaceae). *Rev. Iniciaç. Cient. Univ. Vale Rio Verde*, 10(1), 49–55. <http://dx.doi.org/10.5892/ruvrv.2012.101.4955>

Pitta, M. G. da R., Silva, R. P. dos S., Alves, G. V. S., Angelo, I. C. B. L., Souza, J. M. de, Pessôa, J. R. C. P., Carvalho, J. S. de, Miranda, M. K. V. de, & Souza, M. B. R. de. (2021). Nanocarreadores aplicados ao tratamento do câncer de mama. *Research, Society and Development*, 10(10), e392101018966. <https://doi.org/10.33448/rsd-v10i10.18966>

Pradhan, S., Schwartz, R. A., Patil, A., Grabbe, S., & Goldust, M. (2022). Treatment options for leishmaniasis. *Clin. Exp. Dermatol.*, 47(3), 516–521. <https://doi.org/10.1111/ced.14919>

Prasad, M., Lambe, U. P., Brar, B., Shah, I., J, M., Ranjan, K., Rao, R., Kumar, S., Mahant, S., Khurana, S. K., Iqbal, H. M. N., Dhama, K., Misri, J., & Prasad, G. (2018). Nanotherapeutics: An insight into healthcare and multi-dimensional applications in medical sector of the modern world. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 97, 1521–1537. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2017.11.026>

Qasim, M., Lim, D.-J., Park, H., & Na, D. (2014). Nanotechnology for Diagnosis and Treatment of Infectious Diseases. *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*, 14(10), 7374–7387. <https://doi.org/10.1166/jnn.2014.9578>

Rai, V. K., Mishra, N., Yadav, K. S., & Yadav, N. P. (2018). Nanoemulsion as pharmaceutical carrier for dermal and transdermal drug delivery: Formulation development, stability issues, basic considerations and applications. *Journal of Controlled Release*, 270, 203–225. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2017.11.049>

Ramírez-Macías, I., Marín, C., Chahboun, R., Olmo, F., Messouri, I., Huertas, O., Rosales, M. J., Gutierrez-Sánchez, R., Alvarez-Manzaneda, E., & Sánchez-Moreno, M. (2012). In vitro evaluation of new terpenoid derivatives against *Leishmania infantum* and *Leishmania braziliensis*. *Memórias Do Instituto Oswaldo Cruz*, 107(3), 370–376. doi: 10.1590/s0074-02762012000300012.

Regis, L. H. V., Silva, A. F. da, & Guedes, J. P. de M. (2021). O uso de nanotecnologia em fármacos no Brasil. *Research, Society and Development*, 10(15), e32101522294. <https://doi.org/10.33448/rsd-v10i15.22294>

Registre, C., Soares, R. D. O. A., Rubio, K. T. S., Santos, O. D. H., & Carneiro, S. P. (2023). A Systematic Review of Drug-Carrying Nanosystems Used in the Treatment of Leishmaniasis. *ACS Infectious Diseases*, 9(3), 423–449. <https://doi.org/10.1021/acscinfecdis.2c00632>

Resende, F. A., Nogueira, C. H., Espanha, L. G., Boldrin, P. K., Oliveira-Höhne, A. P., Santoro de Camargo, M., Quintino da Rocha, C., Vilegas, W., & Varanda, E. A. (2017). In vitro toxicological assessment of *Arrabidaea brachypoda* (DC.) Bureau: Mutagenicity and estrogenicity studies. *Regul. Toxicol. Pharmacol.*, 90, 29–35. doi: 10.1016/j.yrtph.2017.08.010.

Ribeiro, T. G., Chávez-Fumagalli, M. A., Valadares, D. G., Franca, J. R., Lage, P. S., Duarte, M. C., Andrade, P. H. R., Martins, V. T., Costa, L. E., Arruda, A. L. A., Faraco, A. A. G., Coelho, E. A. F., & Castilho, R. O. (2014). Antileishmanial activity and cytotoxicity of Brazilian plants. *Experimental Parasitology*, 143, 60–68. <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2014.05.004>

Rijal, S., Ostyn, B., Uranw, S., Rai, K., Bhattarai, N. R., Dorlo, T. P. C., Beijnen, J. H., Vanaerschot, M., Decuypere, S., Dhakal, S. S., Das, M. L., Karki, P., Singh, R., Boelaert, M., & Dujardin, J. C. (2013). Increasing failure of miltefosine in the treatment of kala-azar in nepal and the potential role of parasite drug resistance, reinfection, or noncompliance. *Clin. Infect. Dis.*, 56(11), 1530–1538. doi: 10.1093/cid/cit102.

Roatt, B. M., de Oliveira Cardoso, J. M., de Brito, R. C. F., Coura-Vital, W., de Oliveira Aguiar-Soares, R. D., & Reis, A. B. (2020). Recent advances and new strategies on leishmaniasis treatment. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 104(21), 8965–8977. <https://doi.org/10.1007/s00253-020-10856-w>

Rocha, L. G., Almeida, J. R. G. S., Macêdo, R. O., & Barbosa-Filho, J. M. (2005). A review of natural products with antileishmanial activity. *Phytomedicine*, 12(6–7), 514–535. <https://doi.org/10.1016/j.phymed.2003.10.006>

Rocha, V. P. C., da Rocha, C. Q., Queiroz, E. F., Marcourt, L., Vilegas, W., Grimaldi, G. B., Furrer, P., Allémann, E., Wolfender, J. L., & Soares, M. B. P. (2019). Antileishmanial activity of dimeric flavonoids isolated from *Arrabidaea brachypoda*. *Mol.*, 24(1), 1-13. doi: 10.3390/molecules24010001.

Rodríguez-Romero, A., Hernández-Santoyo, A., del Pozo Yauner, L., Kornhauser, A., & Fernández-Velasco, D. A. (2002). Structure and Inactivation of Triosephosphate Isomerase from *Entamoeba histolytica*. *J. Mol. Biol.*, 322(4), 669–675. [https://doi.org/10.1016/S0022-2836\(02\)00809-4](https://doi.org/10.1016/S0022-2836(02)00809-4)

Romero, G. A. S., Costa, D. L., Costa, C. H. N., de Almeida, R. P., de Melo, E. V., de Carvalho, S. F. G., Rabello, A., de Carvalho, A. L., Sousa, A. de Q., Leite, R. D., Lima, S. S., Amaral, T. A., Alves, F. P., & Rode, J. (2017). Efficacy and safety of available treatments for visceral leishmaniasis in Brazil: A multicenter, randomized, open label trial. *PLoS Negl. Trop. Dis.*, 11(6), 1–25. doi: 10.1371/journal.pntd.0005706.

Roux, B., Nina, M., Pomès, R., & Smith, J. C. (1996). Thermodynamic stability of water molecules in the bacteriorhodopsin proton channel: a molecular dynamics free energy perturbation study. *Biophys. J.*, 71(2), 670–681. doi: 10.1016/S0006-3495(96)79267-6

Salay, L. C., Prazeres, E. A., Marín Huachaca, N. S., Lemos, M., Piccoli, J. P., Sanches, P. R. S., Cilli, E. M., Santos, R. S., & Feitosa, E. (2018). Molecular interactions between Pluronic F127 and the peptide tritriptin in aqueous solution. *Colloid and Polymer Science*, 296(4), 809–817. <https://doi.org/10.1007/s00396-018-4304-0>

Saleem, K., Khursheed, Z., Hano, C., Anjum, I., & Anjum, S. (2019). Applications of Nanomaterials in Leishmaniasis: A Focus on Recent Advances and Challenges. *Nanomaterials*, 9(12), 1749. <https://doi.org/10.3390/nano9121749>

Salgado, C.; Morin, H.; Coriolano de Aquino, N.; Neff, L.; Quintino da Rocha, C.; Vilegas, W.; Marcourt, L.; Wolfender, J.-L.; Jordan, O.; Ferreira Queiroz, E.; Allémann, E. In Vitro Anti-Inflammatory Activity in Arthritic Synoviocytes of *A. brachypoda* Root Extracts and Its Unusual Dimeric Flavonoids. *Mol.* 2020, 25, 5219. <https://doi.org/10.3390/molecules25215219>

Salvi, V. R., & Pawar, P. (2019). Nanostructured lipid carriers (NLC) system: A novel drug targeting carrier. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, 51, 255–267. <https://doi.org/10.1016/j.jddst.2019.02.017>

Santiago, A. S., Pita, S. S. da R., & Guimarães, E. T. (2021). Tratamento da leishmaniose, limitações da terapêutica atual e a necessidade de novas alternativas: Uma revisão narrativa. *Research, Society and Development*, 10(7), e29510716543. <https://doi.org/10.33448/rsd-v10i7.16543>

Santos, D. C. M. dos, de Souza, M. L. S., Teixeira, E. M., Alves, L. L., Vilela, J. M. C., Andrade, M., Carvalho, M. das G., Fernandes, A. P., Ferreira, L. A. M., & Aguiar, M. M. G. (2018). A new nanoemulsion formulation improves antileishmanial activity and reduces toxicity of amphotericin B. *Journal of Drug Targeting*, 26(4), 357–364. <https://doi.org/10.1080/1061186X.2017.1387787>

SANTOS-LIMA, T. M., SANTOS, D. R. V., SOUZA, R. M., BASTOS, N. G., VANNIER-SANTOS, M. A., NUNES, E. S., & DIAS-LIMA, A. G. (2016). Plantas medicinais com ação antiparasitária: conhecimento tradicional na etnia Kantaruré, aldeia Baixa das Pedras, Bahia, Brasil. *Revista Brasileira de Plantas Medicinais*, 18(1 suppl 1), 240–247. https://doi.org/10.1590/1983-084X/15_063

Saramago, L., Gomes, H., Aguilera, E., Cerecetto, H., González, M., Cabrera, M., Alzugaray, M., da Silva Vaz Junior, I., Nunes da Fonseca, R., Aguirre-López, B., Cabrera, N., Pérez-Montfort, R., Merlino, A., Moraes, J., & Álvarez, G. (2018). Novel and Selective Rhipicephalus microplus Triosephosphate Isomerase Inhibitors with Acaricidal Activity. *Vet. Sci.*, 5(3), 74. <https://doi.org/10.3390/vetsci5030074>

Sasidharan, S., & Saudagar, P. (2021). Leishmaniasis: where are we and where are we heading? *Parasitology Research*, 120(5), 1541–1554. <https://doi.org/10.1007/s00436-021-07139-2>

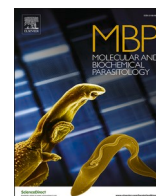
SCHAFFAZICK, S. R., POHLMANN, A. R., FREITAS, L. de L., & GUTERRES, S. S. (2002). Caracterização e Estudo de Estabilidade de Suspensões de Nanocápsulas e de Nanoesferas Poliméricas Contendo Diclofenaco. *Acta Farmacéutica Bonaerense*, 21(2), 99–106.

- Schaffazick, S. R., Guterres, S. S., Freitas, L. de L., & Pohlmann, A. R. (2003). Caracterização e estabilidade físico-química de sistemas poliméricos nanoparticulados para administração de fármacos. *Química Nova*, 26(5), 726–737. <https://doi.org/10.1590/S0100-40422003000500017>
- Schneidman-Duhovny, D., Inbar, Y., Nussinov, R., & Wolfson, H. J. (2005). PatchDock and SymmDock: servers for rigid and symmetric docking. *Nucleic Acids Res.*, 33, 363–367. doi: 10.1093/nar/gki481.
- Shnoudeh, A. J., Hamad, I., Abdo, R. W., Qadumii, L., Jaber, A. Y., Surchi, H. S., & Alkelany, S. Z. (2019). Synthesis, Characterization, and Applications of Metal Nanoparticles. In *Biomaterials and Bionanotechnology* (pp. 527–612). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-814427-5.00015-9>
- Silva, R. C. R. da, Cruz, L. N. P. D., Coutinho, J. M. da S., Fonseca-Alves, C. E., Rebêlo, J. M. M., & Pereira, S. R. F. (2021). Experimental transmission of *Leishmania* (*Leishmania*) *amazonensis* to immunosuppressed mice through the bite of *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae) results in cutaneous leishmaniasis. *Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo*, 63, 1-10. <https://doi.org/10.1590/S1678-9946202163081>
- SILVERSTEIN, R. M., WEBSTER, F. X., & KIELME, D. J. (2012). Identificação Espectrométrica de Compostos Orgânicos. LTC.
- SIMÕES, C. M. O. ;, SCHENKEL, E. P. ;, GOSMANN, G. ;, MELLO, J. C. P. ;, MENTZ, L. A. ;, & PETROVICK, P. R. (2004). Farmacognosia: da planta ao medicamento. (5 ed., Vol. 5). Editora da UFSC.
- Singh, N. P., McCoy, M. T., Tice, R. R., & Schneider, E. L. (1988). A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Exp. Cell Res.*, 175(1), 184–191. doi: 10.1016/0014-4827(88)90265-0.
- Singh, O. P., & Sundar, S. (2014). Immunotherapy and targeted therapies in treatment of visceral leishmaniasis: Current status and future prospects. In *Frontiers in Immunology*, 5(6), pp. 1–9.
- Sousa, P. S. de. (2022). Perfil epidemiológico da leishmaniose visceral em uma macrorregião do Maranhão utilizando dados do sistema de informações de saúde DATASUS. *E-Acadêmica*, 3(3), e6733385. <https://doi.org/10.52076/eacad-v3i3.385>
- Sousa, P. S. de. (2022). Perfil epidemiológico da leishmaniose visceral em uma macrorregião do Maranhão utilizando dados do sistema de informações de saúde DATASUS. *E-Acadêmica*, 3(3), e6733385. <https://doi.org/10.52076/eacad-v3i3.385>
- Sun, J., Yang, Z., & Teng, L. (2020). Nanotechnology and Microtechnology in Drug Delivery Systems. *Dose-Response*, 18(2), 155932582090781. <https://doi.org/10.1177/1559325820907810>
- Su, K.-Y., Yu, C. Y., Chen, Y.-W., Huang, Y.-T., Chen, C.-T., Wu, H.-F., & Chen, Y.-L. S. (2014). Rutin, a Flavonoid and Principal Component of *Saussurea involucreata*, Attenuates Physical Fatigue in a Forced Swimming Mouse Model. *International Journal of Medical Sciences*, 11(5), 528–537. <https://doi.org/10.7150/ijms.8220>

- Tempone, A. G. (2004). Targeting *Leishmania (L.) chagasi* amastigotes through macrophage scavenger receptors: the use of drugs entrapped in liposomes containing phosphatidylserine. *J. Antimicrob. Chemother.*, 54(1), 60–68. <https://doi.org/10.1093/jac/dkh281>
- Téllez-Valencia, A., Olivares-Illana, V., Hernández-Santoyo, A., Pérez-Montfort, R., Costas, M., Rodríguez-Romero, A., López-Calahorra, F., Tuena de Gómez-Puyou, M., & Gómez-Puyou, A. (2004). Inactivation of Triosephosphate Isomerase from *Trypanosoma cruzi* by an Agent that Perturbs its Dimer Interface. *J. Mol. Biol.*, 341(5), 1355–1365. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2004.06.056>
- Tice, R. R., Agurell, E., Anderson, D., Burlinson, B., Hartmann, A., Kobayashi, H., Miyamae, Y., Rojas, E., Ryu, J.-C., & Sasaki, Y. F. (2000). Single cell gel/comet assay: Guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing. *Environ. Mol. Mutagen.*, 35(3), 206–221. doi: 10.1002/(sici)1098-2280(2000)35:3<206::aid-em8>3.0.co;2-j.
- Tiuman, T. S., Santos, A. O., Ueda-Nakamura, T., Filho, B. P. D., & Nakamura, C. v. (2011). Recent advances in leishmaniasis treatment. *International Journal of Infectious Diseases*, 15(8), e525–e532. <https://doi.org/10.1016/j.ijid.2011.03.021>
- Vázquez-Jiménez, L. K., Moreno-Herrera, A., Juárez-Saldivar, A., González-González, A., Ortiz-Pérez, E., Paz-González, A. D., Palos, I., Ramírez-Moreno, E., & Rivera, G. (2022). Recent Advances in the Development of Triose Phosphate Isomerase Inhibitors as Antiprotozoal Agents. *Curr. Med. Chem.*, 29(14), 2504–2529. <https://doi.org/10.2174/0929867328666210913090928>
- Venkatesan, R., Alahuhta, M., Pihko, P. M., & Wierenga, R. K. (2011). High resolution crystal structures of triosephosphate isomerase complexed with its suicide inhibitors: The conformational flexibility of the catalytic glutamate in its closed, liganded active site. *Protein Sci.*, 20(8), 1387–1397. <https://doi.org/10.1002/pro.667>
- Von Stebut, E. (2015). Leishmaniasis. *JDDG: Journal Der Deutschen Dermatologischen Gesellschaft*, 13(3), 191–201. <https://doi.org/10.1111/ddg.12595>
- Vyas, S. P., & Gupta, S. (2006). Optimizing efficacy of amphotericin B through nanomodification. *International Journal of Nanomedicine*, 1(4), 417–432. <https://doi.org/10.2147/nano.2006.1.4.417>
- Walkey, C. D., Olsen, J. B., Guo, H., Emili, A., & Chan, W. C. W. (2012). Nanoparticle Size and Surface Chemistry Determine Serum Protein Adsorption and Macrophage Uptake. *Journal of the American Chemical Society*, 134(4), 2139–2147. <https://doi.org/10.1021/ja2084338>
- Wilczewska, A. Z., Niemirowicz, K., Markiewicz, K. H., & Car, H. (2012). Nanoparticles as drug delivery systems. *Pharmacological Reports*, 64(5), 1020–1037. [https://doi.org/10.1016/S1734-1140\(12\)70901-5](https://doi.org/10.1016/S1734-1140(12)70901-5)
- World Health Organization (WHO). (2022). Leishmaniasis. Fact Sheets. <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/leishmaniasis>

- Wong, I. L. K., Chan, K.-F., Chan, T. H., & Chow, L. M. C. (2012). Flavonoid Dimers as Novel, Potent Antileishmanial Agents. *J. Med. Chem.*, 55(20), 8891–8902. <https://doi.org/10.1021/jm301172v>
- Wu, Y., Luo, Y., & Wang, Q. (2012). Antioxidant and antimicrobial properties of essential oils encapsulated in zein nanoparticles prepared by liquid–liquid dispersion method. *LWT - Food Science and Technology*, 48(2), 283–290. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2012.03.027>
- Wulff-Pérez, M., de Vicente, J., Martín-Rodríguez, A., & Gálvez-Ruiz, M. J. (2012). Controlling lipolysis through steric surfactants: New insights on the controlled degradation of submicron emulsions after oral and intravenous administration. *International Journal of Pharmaceutics*, 423(2), 161–166. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2011.12.025>
- Wyrepkowski, C. D. C., Wyrepkowski, C. D. C., Paz, A. da C., Jensen, B. B., & Franco, A. M. R. (2020). Aspectos farmacológicos da terapia medicamentosa utilizada para a leishmaniose cutânea: uma revisão de literatura. *Rev. Eletr. Acervo Saúde*, 12(8), 33-52. <https://doi.org/10.25248/reas.e3352.2020>
- Yoon, G., Park, J. W., & Yoon, I.-S. (2013). Solid lipid nanoparticles (SLNs) and nanostructured lipid carriers (NLCs): recent advances in drug delivery. *Journal of Pharmaceutical Investigation*, 43(5), 353–362. <https://doi.org/10.1007/s40005-013-0087-y>
- Zielińska, A., Carreiró, F., Oliveira, A. M., Neves, A., Pires, B., Venkatesh, D. N., Durazzo, A., Lucarini, M., Eder, P., Silva, A. M., Santini, A., & Souto, E. B. (2020). Polymeric Nanoparticles: Production, Characterization, Toxicology and Ecotoxicology. *Molecules*, 25(16), 3731. <https://doi.org/10.3390/molecules25163731>
- Zomosa-Signoret, V., Hernández-Alcántara, G., Reyes-Vivas, H., Martínez-Martínez, E., Garza-Ramos, G., Pérez-Montfort, R., Tuena de Gómez-Puyou, M., & Gómez-Puyou, A. (2003). Control of the Reactivation Kinetics of Homodimeric Triosephosphate Isomerase from Unfolded Monomers. *Biochem.*, 42(11), 3311–3318. doi: 10.1021/bi0206560.

APÊNDICE I
(Artigos publicados)



Anti-Leishmania activity and molecular docking of unusual flavonoids-rich fraction from *Arrabidaea brachypoda* (Bignoniaceae)

Monica A. das Neves^a, Jessyane R. do Nascimento^b, Vera Lucia Maciel-Silva^c,
Alberto M. dos Santos^d, Jaldyr de Jesus G.V. Junior^e, Ana Jessica S. Coelho^f,
Mayara Ingrid S. Lima^f, Silma Regina F. Pereira^{f,1}, Cláudia Q. da Rocha^{a,*,1}

^a UFMA-Federal University of Maranhão, Center for Exact Sciences and Technology (CCET), Post Graduate Program in Chemistry, São Luís CEP 65080-805, Brazil

^b UNESP, São Paulo State University Júlio de Mesquita Filho, Institute of Chemistry, Post Graduate Program in Chemistry, Araraquara CEP 14800-060, Brazil

^c UEMA, Maranhão State University, Center for Education, Exact and Natural Sciences (CECEN), Department of Biology, CEP: 65055-310, São Luís, Brazil

^d UNICAMP - University of Campinas, Institute of Chemistry and Center for Computer in Engineering and Sciences, Campinas CEP 13084-862, Brazil

^e UFMA-Federal University of Maranhão, University College (COLUN), São Luís CEP 65080-805, Brazil

^f UFMA-Federal University of Maranhão, Laboratory of Genetics and Molecular Biology, Department of Biology, São Luís CEP 65080-805, Brazil

ARTICLE INFO

Keywords:

Leishmaniasis
Dimeric flavonoids
Cytotoxicity
Genotoxicity
Molecular docking

ABSTRACT

Leishmaniasis comprise a group of infectious parasitic diseases caused by various species of *Leishmania* and are considered a significant public health problem worldwide. Only a few medications, including miltefosine, amphotericin B, and meglumine antimonate, are used in current therapy. These medications are associated with severe side effects, low efficacy, high cost, and the need for hospital support. Additionally, there have been occurrences of drug resistance. Additionally, only a limited number of drugs, such as meglumine antimonate, amphotericin B, and miltefosine, are available, all of which are associated with severe side effects. In this context, the need for new effective drugs with fewer adverse effects is evident. Therefore, this study investigated the anti-*Leishmania* activity of a dichloromethane fraction (DCMF) extracted from *Arrabidaea brachypoda* roots. This fraction inhibited the viability of *L. infantum*, *L. braziliensis*, and *L. Mexicana* promastigotes, with IC₅₀ values of 10.13, 11.44, and 11.16 µg/mL, respectively, and against *L. infantum* amastigotes (IC₅₀ = 4.81 µg/mL). Moreover, the DCMF exhibited moderate cytotoxicity (CC₅₀ = 25.15) towards RAW264.7 macrophages, with a selectivity index (SI) of 5.2. Notably, the DCMF caused damage to the macrophage genome only at 40 µg/mL, which is greater than the IC₅₀ found for all *Leishmania* species. The results suggest that DCMF demonstrates similar antileishmanial effectiveness to isolated bradydin B, without causing genotoxic effects on mammalian cells. This finding is crucial because the isolation of the compounds relies on several steps and is very costly while obtaining the DCMF fraction is a simple and cost-effective process. Furthermore, In addition, the potential mechanisms of action of bradydins were also investigated. The computational analysis indicates that bradydin compounds bind to the Triosephosphate isomerase (TIM) enzyme via two main mechanisms: destabilizing the interface between the homodimers and interacting with catalytic residues situated at the site of binding. Based on all the results, DCMF exhibits promise as a therapeutic agent for leishmaniasis due to its significantly reduced toxicity in comparison to the adverse effects associated with current reference treatments.

1. Introduction

Leishmaniasis is a highly neglected infectious parasitic disease caused by several species of *Leishmania*. It is endemic in 98 countries and territories and remains a major global health concern, particularly in eco-epidemiological regions such as the Americas, East Africa, North

Africa, and West/Southeast Asia, where annually 600,000–1 million new cases of cutaneous leishmaniasis and 50,000–90,000 cases of visceral leishmaniasis occur, representing a significant public health issue [1]. Human cutaneous leishmaniasis is caused by at least twelve species, seven of which are found in Brazil: *Leishmania* (*V.*) *braziliensis*, *L.* (*V.*) *guyanensis*, *L.* (*L.*) *amazonensis*, *L.* (*V.*) *lainsoni*, *L.* (*V.*) *naiffi*, *L.* (*V.*)

* Corresponding author.

E-mail address: rocha.claudia@ufma.br (C.Q. da Rocha).

¹ These authors contributed equally to this paper.

lindenberg, and *L. (V.) shawi*, with *L. braziliensis* being the most reported. On the other hand, visceral leishmaniasis, the most severe form of the disease, is caused by *Leishmania infantum* and has been reported in at least 12 Latin American countries, with Brazil accounting for 90 % of all cases [2].

Current treatments for leishmaniasis primarily rely on pentavalent antimonials (meglumine antimony and sodium stibogluconate) and non-antimonials (pentamidine, amphotericin B, paromomycin, and miltefosine) [3]. However, despite their effectiveness against several *Leishmania* species, these drugs often induce severe adverse effects, including relapses, genotoxicity, parasite resistance, and high toxicity [4–9]. Given these limitations, the discovery of new drugs and biochemical targets is essential. Natural products have long been explored as potential sources of bioactive compounds for treating various diseases, including neglected tropical diseases caused by protozoa [10]. Research on active compounds present in plant extracts with leishmanicidal activity has highlighted flavonoids, triterpenoids, steroids, and tannins as promising candidates [11].

Arrabidaea brachypoda Bureau, a typical Brazilian cerrado plant known as "cervinha do campo" or "cipó-uma," is phytochemically rich in flavonoids, triterpenes, saponins, tannins, and polyphenols [12]. Traditionally, it has been used for treating kidney stones, arthritis, and has shown various other properties, including antifungal, antiviral, antimicrobial, anti-inflammatory, antinociceptive, and anti-*Trypanosoma cruzi* activities [12–17]. More recently, the antileishmanial activity of three dimeric flavonoids (brachydins A, B, and C) present in the dichloromethane fraction (DCMF) of *Arrabidaea brachypoda* roots was identified [18]. Additionally, antitumoral activity has been demonstrated in the DCMF [19–21].

Building upon the findings reported by [18], this study aimed to investigate the antileishmanial potential of the brachyidin-containing DCMF. Our objective was to validate the antileishmanial action of the three brachydins without the need for isolating these compounds, thereby enabling the production of antileishmanial drugs at lower costs. Exploring a brachyidin-enriched bioactive fraction for leishmaniasis treatment may lead to the development of low-cost bioproducts. This study conducted experiments aimed to enhance our understanding of the underlying processes behind the biological activity of brachydins.

We focused on Triosephosphate isomerase (TIM) as a potential target for the DCMF based on its pivotal role in the glycolytic pathway of protozoa parasites, including *Leishmania* species. TIM catalyzes the conversion of dihydroxyacetone phosphate (DHAP) to glyceraldehyde-3-phosphate (G3P) in glycolysis, making it a key enzyme for energy production in these parasites [22]. Inhibiting TIM can disrupt the glycolytic pathway, leading to ATP depletion and ultimately, the death of protozoan parasites [23,24]. Given its significance, TIM is an attractive target for drug development against parasitic infections.

Recently, a structure-based virtual screening (SBVS) of FDA-approved drugs was conducted using the enzyme TIM of *Entamoeba histolytica* and *Giardia lamblia* to identify drugs with antiprotozoal activity [25]. Here, we employed a similar computational approach, utilizing molecular docking, molecular dynamics (MD) simulations, and binding free energy calculations, to elucidate the molecular interactions between brachydins and the enzyme Triosephosphate isomerase in both *Leishmania infantum* (liTIM) and *Leishmania braziliensis* (lbTIM). Although the flavonoid family of natural secondary metabolites has shown promise as potential inhibitors of *Leishmania* TIM activity [26, 27], further research is necessary to explore the specific molecular interactions and inhibitory effects of flavonoids on TIM. Overall, this combined computational and experimental study aims to provide insights into the antileishmanial activity of brachydins. Moreover, to our knowledge, no antileishmanial activity data concerning the DCMF containing the three investigated brachydins are available, making this report the first of its kind.

2. Materials and methods

2.1. Chemicals

Trivalent antimony (Sb^{III}), meglumine antimonate (MA; Sb^{V}), and amphotericin B (AMB) were purchased from Sanofi Aventis (São Paulo, Brazil), Sigma-Aldrich (Munich, Germany), and Cristália (São Paulo, Brazil), respectively, with a minimum purity of 98 %. Cell culture-related reagents were obtained from Gibco/Invitrogen (Massachusetts, USA). All other chemicals were sourced from Sigma-Aldrich (Munich, Germany) and Merck (Munich, Germany).

2.2. Plant material

A. brachypoda roots were collected in April 2017 at Sant'Ana da Serra farm in João Pinheiro, Minas Gerais, Brazil. The plant was identified at the ICEB of the José Badine Herbarium of the Federal University of Ouro Preto by Prof. Maria Cristina Teixeira Braga Messias. A voucher specimen (no. 17935) has been deposited at the Herbarium of the Federal University of Ouro Preto, Brazil. The plant collection was conducted by Brazilian laws concerning the protection of biodiversity (SisGen No. A451DE4).

2.3. Extract obtaining and fractionation

The extract and fraction were obtained as previously described [17]. In summary, *A. brachypoda* roots were dried and ground in a knife mill. Subsequently, the powdered roots were subjected to percolation with ethanol/water (7:3). Following filtration, the ethanolic extract of the roots was collected and then dry-evaporated under reduced pressure (40°C) to yield the crude extract. Next, the ethanolic extract was diluted in H_2O and underwent liquid-liquid partitioning to obtain dichloromethane and methanol/water fractions. The dichloromethane fraction was analyzed using high-performance liquid chromatography photodiode array (HPLC-PDA) detection method and LC-MS. The methods for chemical characterization of the fraction are detailed by Da Rocha et al. [17].

2.4. Cell culture

This study was approved by the Ethics Committee on Animal Experimentation/UFMA (23115.006003/2017-11). RAW 264.7 murine macrophages were provided by the Laboratory of Applied Cancer Immunology, Federal University of Maranhão, Brazil. The cells were cultured in RPMI 1640 medium supplemented with 5 % fetal bovine serum, 1 % streptomycin, and 1 % penicillin at pH 7.4. The macrophages were maintained at 37°C in a humidified atmosphere incubator with 5 % CO_2 . Cells in cultures at approximately 80 % confluence were collected using TryPLE™ Express, washed with PBS, and suspended in RPMI cell culture medium supplemented with 10 % fetal bovine serum, 1 % streptomycin, and 1 % penicillin.

2.5. Parasites

Promastigotes of *L. infantum* (MHOM/BR/1974/PP75), *L. braziliensis* (MHOM/BR/1975/M2903), and *L. mexicana* (MNYC/BZ/1962/M377) were grown at 26°C in Schneider's Insect medium (Sigma-USA) supplemented with 10 % of inactivated fetal bovine serum (Gibco-USA), 1 % streptomycin (Gibco-USA), and 1 % gentamicin (Sigma-Aldrich). Assays were performed with protozoan cultures with a maximum of ten replication passages *in vitro*.

2.6. Anti-promastigote activity

The anti-promastigote activity was assessed for all *Leishmania* species (*L. infantum*, *L. braziliensis*, and *L. mexicana*) using the MTT assay [28].

Promastigotes were cultured in a 96-well plate and maintained at 26°C in Schneider's Insect medium (as described in item 2.5). A total of 1×10^5 parasites/well were seeded and treated with DCMF in a final volume of 200 μ L. Pilot tests determined the final concentrations of DCMF (157 μ g/mL, 78.5 μ g/mL, 39.2 μ g/mL, 19.6 μ g/mL, 9.8 μ g/mL, and 4.9 μ g/mL) utilized in each assay. Amphotericin B (Cristália, Brazil) was used at concentrations of 16 μ g/mL, 8 μ g/mL, 4 μ g/mL, 2 μ g/mL, 1 μ g/mL, and 0.5 μ g/mL (for promastigote assays) or 0.5 μ g/mL, 0.17 μ g/mL, 0.06 μ g/mL, 0.02 μ g/mL, and 0.01 μ g/mL (for amastigote assays). Trivalent antimony (Sigma-Aldrich, USA) was used at concentrations of 553.6 μ g/mL, 276.8 μ g/mL, 138.4 μ g/mL, 69.2 μ g/mL, 34.6 μ g/mL, and 17.3 μ g/mL, while meglumine antimonate (Sanofi Aventis, Brazil) was used at concentrations of 90 μ g/mL, 30 μ g/mL, 10 μ g/mL, 3.3 μ g/mL, and 1.6 μ g/mL, as reference anti-leishmanial drugs. Culture medium with *Leishmania* was used as the negative control, and wells containing only culture medium served as the blank control. After 48 h, the plates were centrifuged at 3000 rpm, the medium was discarded, and 180 μ L of medium and 20 μ L of MTT (5 mg/mL) were added to each well to determine parasite viability. After 3 h, 80 μ L of 10 % SDS in 0.01 N HCl was added to each well to dissolve the formazan crystals. The absorbance was analyzed using an Epoch spectrophotometer (BioTek®) at a wavelength of 470 nm according to the formula:

$$\%viability = \frac{DO_{sample} - DO_{white}}{DO_{negative\ control} - DO_{white}} \bullet 100$$

The results were utilized to calculate the IC₅₀ (the concentration in μ g/mL that inhibits 50 % of parasite growth), as determined by the dose-response curve. Two independent assays were conducted, and each concentration was assessed in triplicate.

2.7. Anti-amastigote activity

Considering that DCMF was effective against the promastigotes of all three *Leishmania* species, the assay for amastigotes was conducted only for one species (*L. infantum*). Therefore, RAW 264.7 macrophages were cultured in a 24-well culture plate (1×10^5 cells/well, at 37°C and 5 % CO₂). The cells were infected with *L. infantum* promastigotes (15 parasites:1 macrophage). After 24 h, the cells were washed with PBS to remove the parasite-free forms. The infected cells were then subjected to a 24-h treatment using the identical concentrations mentioned previously for DCMF, amphotericin B, and meglumine antimonate (as described in item 2.6). The cells were fixed with fast panoptic (Laboclin, Brazil) and mounted with Entellan® new (Merck, Germany) for analysis under an optical microscope (100x). Infected and untreated macrophages were incubated under the same conditions to be used as controls (100 % infection). Two hundred macrophages per coverslip were analyzed to calculate the percentage of infected macrophages [29]. Three experiments were conducted in duplicate.

$$Score = \frac{[(0x n_0) + (1x n_1) + (2x n_2) + (3x n_3) + (4x n_4)]}{\text{total number of cells}}$$

2.8. Cell viability assay

RAW 264.7 murine macrophages (1×10^5 macrophages/well) were cultured in a 96-well plate at 37°C with 5 % CO₂ and treated for 48 h with DCMF, amphotericin B, and meglumine antimonate using the same concentrations as described in item 2.6, in a final volume of 200 μ L. Wells containing untreated cells were utilized as negative controls, and wells without cells, containing only culture medium, served as blank controls. After the 48-h treatment, 20 μ L of MTT (5 mg/mL) was added

to the plate and incubated for 3 h. Subsequently, 80 μ L of 10 % SDS in 0.01 N HCl was added to each well to dissolve the formazan crystals. The absorbance was determined as described previously. The results were employed to calculate the CC₅₀ (the concentration in μ g/mL that inhibits 50 % of cell viability) using the dose-response curve. Two independent assays were conducted in triplicate.

2.9. Selectivity index

The following formula was used to determine the selectivity index (SI): $SI = \frac{CC_{50}}{IC_{50\text{intracellular amastigotes}}}$, where CC₅₀ represents the cytotoxic concentration for 50 % of the cells evaluated in the cell viability assay, and IC₅₀ represents the inhibitory concentration for 50 % of the intracellular amastigote forms, considering the same drug [30].

2.10. Genotoxicity analysis by the Comet assay

Comet assay was performed to evaluate DNA damage according to previous studies [31,32]. RAW 264.7 macrophages were cultured in a 24-well culture plate (1×10^5 cells/well) at 37°C with 5 % CO₂. Treatment occurred for 3 and 24 h, where cells were exposed to 40 μ g/mL, 25 μ g/mL, and 10 μ g/mL of DCMF. The negative, positive, and vehicle controls were untreated cells, H₂O₂ (10 μ L), and DMSO 0.5 %, respectively. After treatment, cells were dissociated with TrypLE™ Express (Gibco, Denmark), centrifuged for 10 min at 1200 rpm at 4°C, and then suspended in 80 μ L of RPMI medium mixed with 100 μ L of low melting point (0.5 %) agarose. This mixture was transferred to a slide pre-coated with a normal melting point of 1.5 % agarose. Then, coverslips were placed on the slides and refrigerated for 5 min. After solidification, the slides were immersed in lysis solution (2.5 M NaCl, 100 mM EDTA, 10 mM Tris, 10 % dimethyl sulfoxide, 1 % Triton X-100, pH 10.0) and refrigerated overnight at 4°C. Subsequently, the slides were incubated in alkaline solution (10 M NaOH, 0.2 M EDTA, and distilled water, pH 13.0) for 30 min at 4°C, followed by electrophoresis at 25 V and 300 mA for 25 min. The slides were neutralized (0.4 M Tris/HCl, pH 7.5), dried at room temperature, and fixed in 100 % ethanol for 4 min. Each slide was stained with 30 μ g/mL ethidium bromide (20 μ g/mL) and analyzed under a fluorescence microscope (BX51/BX52-Olympus; Japan), using a 516–560 nm filter and 590 nm filter barrier with a 40x objective. One hundred nucleoids were analyzed, considering the size and amount of DNA present in the Comet tail. DNA damage was visually classified according to the fragment migration (tail size): class 0 (undamaged nucleoid, absence of tail), class 1 (nucleoid with a short tail, smaller than their diameter), class 2 (tail length one to two times the diameter of the nucleoid), class 3 (with a tail longer than twice the diameter of the nucleoid), and class 4 (nucleoid maximally damaged). Damage score was obtained by multiplying the number of nucleoids in each class by the respective class value, using the equation:

where n is the number of nucleoids in each class.

2.11. Invasion test

RAW 264.7 macrophages were cultured in a 24-well culture plate (1×10^5 cells/well) at 37°C with 5 % CO₂. The cells were infected with promastigotes of *L. infantum* using a 15:1 parasite/cell ratio. After 24 h, cells were washed with PBS to remove parasite-free forms. Infected cells were treated for 24 h with DCMF (39.2 μ g/mL, 19.6 μ g/mL, 9.8 μ g/mL,

and 4.9 µg/mL), amphotericin B (0.5 µg/mL, 0.17 µg/mL, 0.06 µg/mL, and 0.02 µg/mL), or meglumine antimonate (90 µg/mL, 30 µg/mL, 10 µg/mL, and 3.3 µg/mL). The cells were fixed and stained with fast panoptic (Laboclin, Brazil) and sealed with Entellan® new (Merck, Germany) for analysis under an optical microscope (100x). One hundred cells were examined to determine if they were infected and to count the number of intracellular parasites [33].

2.12. Multiplication test

Macrophages were seeded in 24-well culture plates with circular coverslips for 24 h (6×10^4 cells/well), 48 h (4×10^4 cells/well), 72 h (4×10^4 cells/well), and 96 h (2×10^4 cells/well) at 37°C with 5 % CO₂, with an initial extra 24 h to facilitate cell adherence. Cells were infected with promastigote forms of *L. infantum* at a ratio of 15:1 (parasite/cell). After 24 h, the cells were washed twice with PBS to remove the parasite-free forms. Treatment was performed at the same concentrations as described in 2.11. The cells were fixed and stained with fast panoptic (Laboclin, Brazil) and sealed with Entellan® new (Merck, Germany) for analysis under an optical microscope (100x). One hundred cells were analyzed to determine the number of internalized parasites [33].

2.13. Statistical analysis

The normality of the data was analyzed using the Kolmogorov-Smirnov test. ANOVA was performed for parametric data followed by Tukey's post-test, while the Kruskal-Wallis test followed by Dunn's post-test was used for non-parametric data, with both tests adopting a significance level of $p < 0.05$. Statistical analyses and graphs were generated using Prism® software, version 8.00, from GraphPad.

2.14. Structure prediction

First, the crystallographic structure of *Leishmania* TIM was obtained from the Protein Data Bank with accession code 2Y63 [34]. Then, the TIM wild-type sequences of *Leishmania braziliensis* (lbTIM) and *Leishmania infantum* (liTIM) obtained from UniProtKB were remodeled [35] using a homology approach with the Modeller program [36], using the crystallographic structure as a reference.

The modeled lbTIM and liTIM structures were minimized in Amber18 [37] through 50,000 cycles of the steepest-descent method followed by 50,000 cycles of the conjugated gradient method. The protonation state analysis of ionizable residues was performed at neutral pH through pKa calculation using PROPKA3, available on the PDB2PQR server [38].

2.14.1. Molecular docking

To analyze the binding mode of the brachydins compounds 1, 2, and 3 (Fig. 1), molecular docking simulations were performed using the Autodock Vina program [39]. A 20 Å docking grid was positioned on the TIM active site, centered around Glu104. To guide the molecular docking experiment, the following parameters were utilized: 10 runs, 3000 maximum iterations, a population size of 100, a crossing-over rate of 0.9, and a scaling factor of 0.5. All obtained poses were ranked according to the Autodock program score. To validate the docking protocol, redocking simulations were conducted for all compounds using the PatchDock Server [40]. Root Mean Square Deviation (RMSD) values equal to or less than 1.0 Å were considered satisfactory for replicating the ligand binding mode in the crystallographic structure when compared to active site inhibitors. Finally, interactions between the ligands and the lbTIM and liTIM structures were analyzed using the PDBSUM server [40]. After analysis and validation, the top-predicted pose complex obtained from AutoDock Vina was used as the starting point for the MD simulations. Parameters, configurations, and additional information regarding the systems can be found in the supporting information.

2.14.2. Molecular dynamics simulations

Using the Amber18 package [37], MD simulations were conducted for the following lbTIM and liTIM systems: three systems for each compound positioned at the interface between subunits, and another three systems for each compound positioned at the catalytic site. First, the partial atomic charges of the ligands were determined using the Restrained Electrostatic Potential protocol through quantum calculations in the Gaussian09 program, and the molecular charge was calculated by single point using the Hartree-Fock method with the 6-31 G* basis set. The *Leishmania* TIM systems were solvated in the tLeap program using an octahedral truncated water-box with an explicit solvation model TIP3P [41]. The distance between the water-box wall and the atoms of the solvated system was set to 12 Å. Counterions (Cl⁻) were added to the water-box to maintain electroneutrality. The force fields Amberff99SB and General Amber Force Field were used to parametrize the lbTIM structure and the ligands, respectively. An energy minimization protocol with nine steps, including the steepest-descent and conjugate gradient algorithms, was performed for all systems. All hydrogen atoms were minimized by 6000 cycles (3000 cycles of the steepest-descent and 3000 of the conjugate gradient algorithms). Water and ions were minimized by 12,000 cycles (2000 steepest-descent algorithm and 10,000 conjugate gradient). Finally, the whole TIM system was minimized by seven stages of 20,000 cycles (10,000 steepest-descent and 10,000 conjugate gradient), with the progressive decrease of restraints. After completion of the minimization, the systems

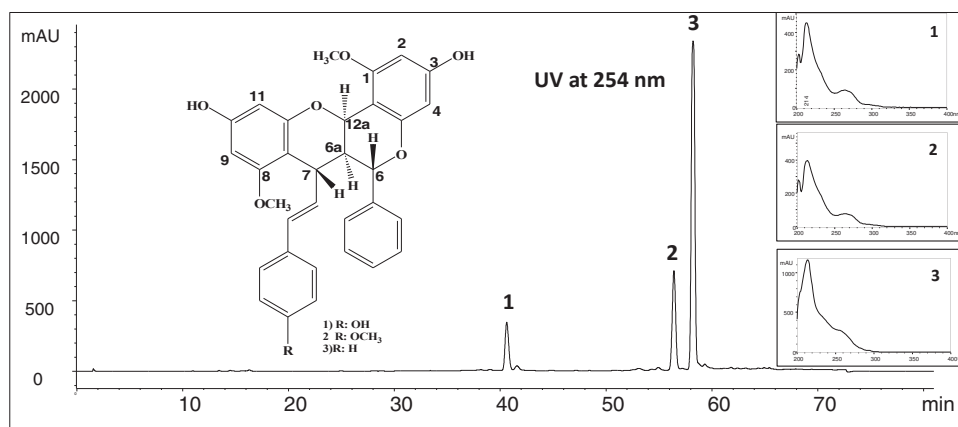


Fig. 1. Chemical structure of the main compounds, brachyidin A (1), brachyidin B (2) and brachyidin C (3) by HPLC-PDA chromatogram and UV spectrum of compounds 1–3 DCMF (dichloromethane fraction).

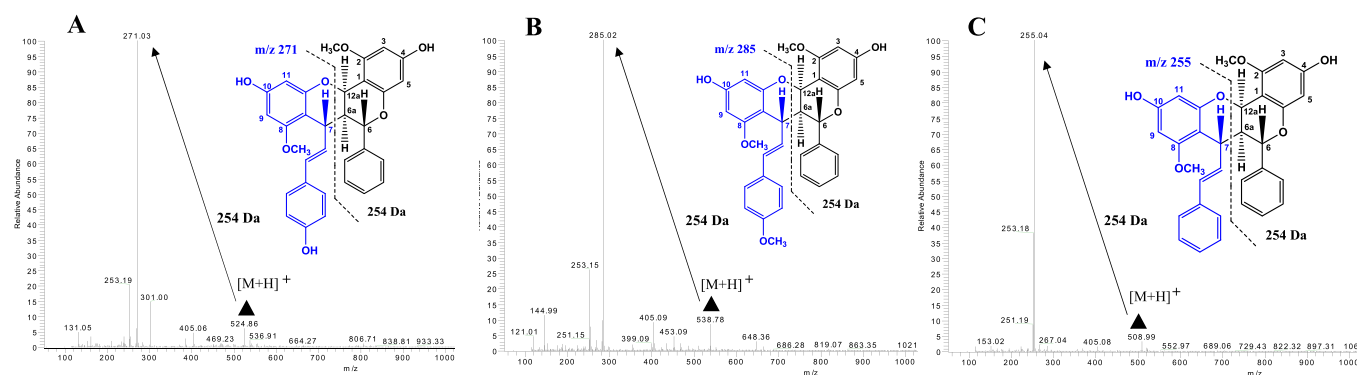


Fig. 2. Fragments observed in the HPLC-ESI-MS/MS analysis of the DCMF of *Arrabidea brachypoda* and characteristic fragmentation of the brachyidin A, B and C. Mass spectrometry data were compared with Da Rocha et al., 2014.

were heated through 5 ns of MD simulation to increase the temperature to 300 K and reach equilibrium. Then, 10 ns of MD simulation was performed on the isobaric-isothermal ensemble. The system temperatures were maintained with the Langevin thermostat, and the Shake algorithm was used to maintain all hydrogen bonds at their pre-defined equilibrium distances obtained during the minimization [41,42], allowing integration cycles of 2 fs. A cutoff of 10 Å was used for the minimum image convention.

2.14.3. Binding free energy calculations

From each MD trajectory of the TIM systems, the last 1 ns, which represents 1000 frames, were used to compute the binding free energy between the ligands and the Pin1 active site residues using the Molecular Mechanics/Poisson-Boltzmann Surface Area (MM-PBSA) method, both available in the Amber18 package [37].

3. Results and discussion

3.1. Chemical characterization of DCMF

The complete chemical characterization of DCMF and the quantification of brachydins in the fractions are described in previous works conducted by our research group [17,43].

To confirm the presence of brachydins in DCMF, an LC-MS analysis was conducted and compared with the authentic patterns of brachydins isolated by our group.

Table 1

Half-maximal inhibitory concentration detected in *Leishmania* spp and macrophages treated with dichloromethane fraction, amphotericin B, meglumine antimoniate or trivalent antimonate (Sb^{III}).

Compound	IC ₅₀ (μg/mL) Promastigotes			IC ₅₀ (μg/mL) Amastigotes		
	<i>L. infantum</i>	<i>L. braziliensis</i>	<i>L. mexicana</i>	CC ₅₀ MΦ	<i>L. infantum</i>	SI
DCMF	10.13 ±0.54	11.44 ±0.70	11.16 ±0.56	25.15 ±1.58	4.81 ±0.73	5.2
AMB	2.93 ±0.29	2.44±0.29	2.87 ±0.27	6.64 ±0.49	0.16 ±0.03	41.5
MA	-	-	-	2.13 ±0.45	5.89 ±2.20	0.36
Sb ^{III}	33.58 ±4.07	34.77 ±4.87	48.19 ±4.92	-	-	-

DCMF: dichloromethane fraction; AMB: amphotericin B; MA: meglumine antimoniate; Sb^{III}: trivalent antimony (promastigotes assays); MA: meglumine antimoniate (intracellular amastigotes assays); MΦ: macrophages; CC₅₀: cytotoxic concentration to 50 % of macrophages; IC₅₀: cytotoxic concentration to 50 % of parasites; SI: selectivity index (CC₅₀/IC₅₀); * Infection rate (%) for *Leishmania infantum* (MHOM/BR/74/PP75): 71.5 ± 1.65.

3.2. DCMF presents antileishmanial activity

Table 1 presents the results of DCMF activity against the *Leishmania* species. Antiparasitic activity was detected in a concentration-dependent manner against *L. infantum* (IC₅₀ = 10.13 μg/mL), *L. braziliensis* (IC₅₀ = 11.44 μg/mL), and *L. mexicana* (IC₅₀ = 11.16 μg/mL) promastigotes forms. Interestingly, the DCMF IC₅₀ was significantly lower than the IC₅₀ of trivalent antimony (Sb^{III}) for all *Leishmania* species. Similar results were found when DCMF was tested against amastigote forms (IC₅₀ = 4.81 μg/mL for DCMF; IC₅₀ = 5.89 μg/mL for MA; and IC₅₀ = 0.16 μg/mL for AMB).

Meglumine antimoniate was the most toxic compound. Treatments employing this drug are only effective when administered continuously and appropriately, with therapy failure and the emergence of resistant forms occurring at low doses and in discontinuous treatments [44]. Additionally, several side effects may occur, such as muscle and skeletal pain, nausea, vomiting, diarrhea, abdominal pain, headache, anorexia, asthenia, fever, fatigue, exanthema, erythema, urticaria, hepatotoxicity, and pain at the drug application site [45]. Conversely, amphotericin B exhibited the lowest IC₅₀ value for both promastigote and amastigote forms. Nevertheless, adverse effects associated with AMB include fevers, chills, hypotension or hypertension, renal, hematological, and hepatic toxicity [46,47]. It is noteworthy that, in addition to efficacy and safety, the costs of a given health intervention must also be considered. In this regard, amphotericin B presents the highest costs [48,49], restricting therapy access, especially in the poorest endemic countries. Moreover, leishmaniasis treatment costs encompass treatment toxicity monitoring, hospitalization for drug administration, and specialized professionals.

The DCMF cytotoxic concentration was the highest for macrophages (CC₅₀ = 25.15 μg/mL) (Table 1), while AMB presented the highest selectivity index value. (SI = 41.5), followed by DCMF (SI = 5.2) and MA (SI = 0.36).

Pereira and collaborators [50] investigated the antileishmanial activity of hexanic, acetate-ethyl, butanolic, and aqueous fractions obtained from a hydro-ethanolic extract isolated from *A. brachypoda* stem, roots, and leaves. The results indicate that the acetate-ethyl fraction (SI = 10.75) obtained from leaves is most active against *L. amazonensis*, inhibiting promastigotes and amastigotes at 3.94±0.13 μg/mL and 14.1±0.08 μg/mL, respectively, with a cytotoxic concentration of 151.62 μg/mL noted in murine peritoneal macrophages. The promising data presented by the ethyl acetate fraction obtained from *A. brachypoda* leaves corroborate the hypothesis that fractions obtained with medium polarity solvents can be very active due to the presence of non-glycosylated compounds, as is the case with DCMF obtained from *A. brachypoda* roots, which is rich in non-glycosylated brachydins. Aglycone brachydins may have a role in increasing lipophilicity, which in turn could increase the fraction penetration into protozoan cell membranes. Furthermore, brachydins may inhibit the activity of enzymes involved in the parasite's glycolytic pathway. This inhibition is

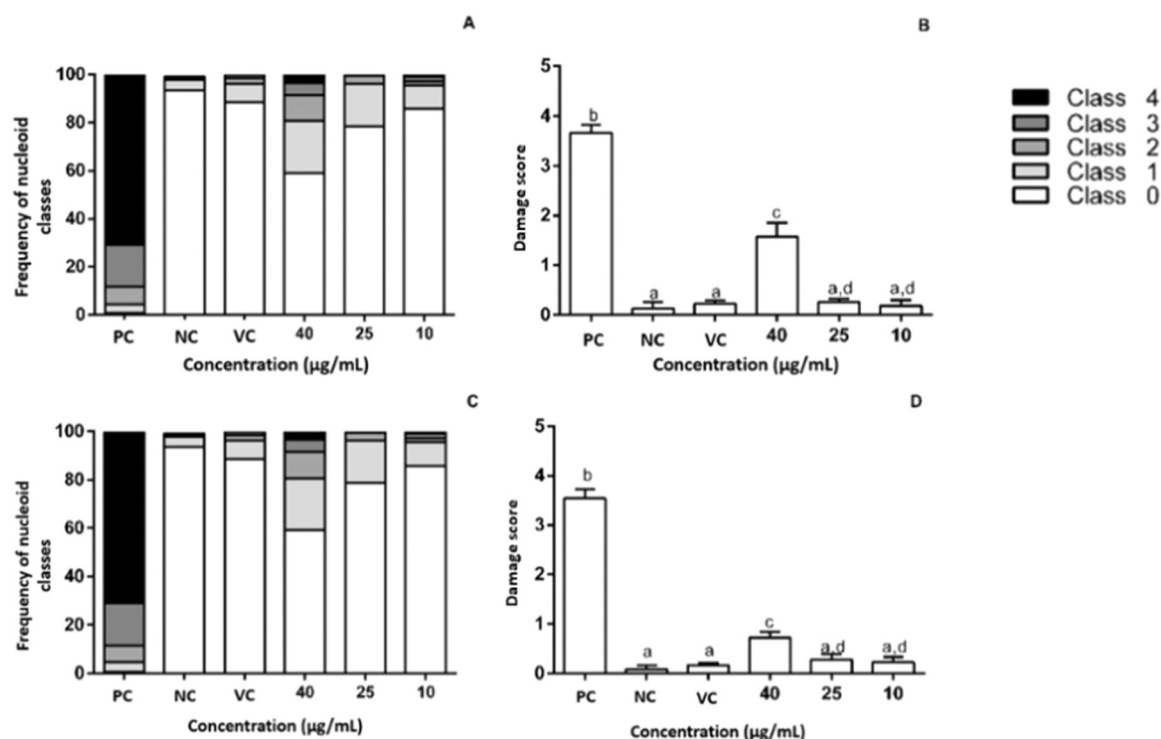


Fig. 3. Frequencies of nucleoid classes and their respective damage scores detected after 3 h (A and B, respectively) and 24 h (C and D, respectively) detected by Comet assay performed on macrophages of RAW 264.7 strain treated with the DCMF at 40 µg/mL, 25 µg/mL and 10 µg/mL. NC: negative control (RPMI 1640 culture medium). PC: positive control (H₂O₂). VC: vehicle control (macrophages exposed to 0.5 % DMSO).

crucial in preventing the parasite from evading or resisting the innate immune response, which is critical for infection maintenance.

3.3. DCMF does not induce *in vitro* DNA damage

The frequencies of nucleoid classes in uninfected RAW 264.7 cells were determined using the comet assay. DCMF concentrations were based on the previously conducted cytotoxicity test (40 µg/mL, 25 µg/mL, and 10 µg/mL), corresponding to 10, 50, and 90 % cell viability, respectively. Only the highest DCMF concentration (40 µg/mL) induced DNA damage at both exposure times (3 and 24 h) (Fig. 3), which is approximately 4-fold higher than the IC₅₀ determined for all *Leishmania* species, and 1.6-fold higher than the CC₅₀ determined for macrophages (Table 1). Our data corroborate other studies reporting the ability of bradydins to induce DNA damage in different cells [19,21,51]. Interestingly, previous study [19] also described ultrastructural alterations in

membrane cells exposed to DCMF, similar to those observed herein in *L. infantum*-infected macrophages treated with DCMF.

Hence, in contrast to other antileishmanial drugs, which have been reported as genotoxic [4,6,52,53], bradydins may act by disrupting cell membranes instead of damaging DNA, suggesting that *in vivo* preclinical trials may be performed.

3.4. DCMF reduces *L. infantum*'s ability to invade macrophages

DCMF was able to decrease the number of macrophages infected by *L. infantum* in a dose-dependent manner. ($p < 0.001$). The two highest concentrations (39.2 µg/mL and 19.6 µg/mL) reduced the number of infected cells by 49 % and 44 %, respectively, and the frequency of internalized amastigotes by 47 % and 40 %, respectively (Fig. 4). Interestingly, other study [17] demonstrated that DCMF was more effective than benznidazole in reducing the amount of intracellular

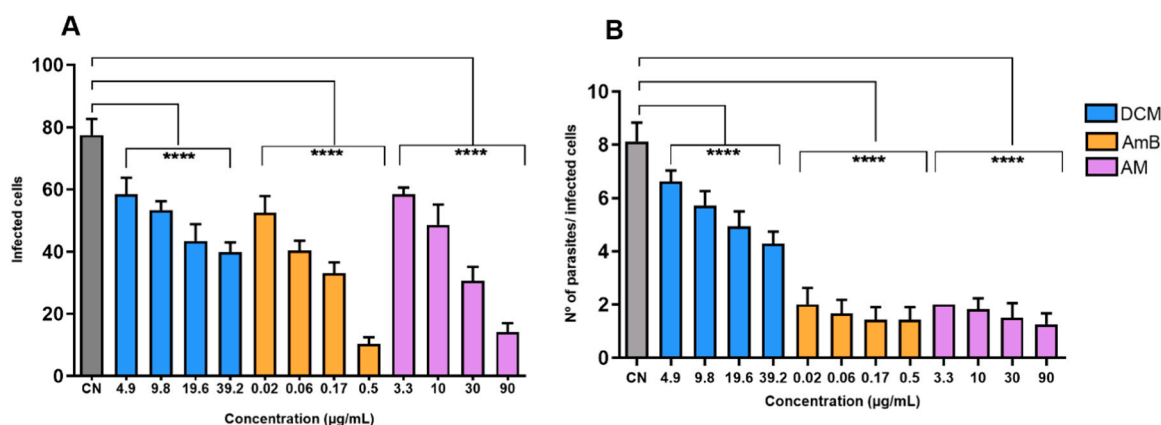


Fig. 4. Number of macrophages (RAW 264.7) infected with *L. infantum* promastigotes (A) and number of internalized amastigotes (B) after 24 h of treatment with dichloromethane fraction (DCM), Amphotericin B (AMB) or Meglumine antimonate (AM), NC: negative control (no treatment).

T. cruzi in BALB/c mouse macrophages by 92 %.

It is noteworthy that meglumine antimoniate decreased the number of infected cells by 63.3 % and 46.8 % at 90 $\mu\text{g/mL}$ and 30 $\mu\text{g/mL}$, respectively, comparable to the results obtained with a lower DCMF concentration (39.2 $\mu\text{g/mL}$). On the other hand, amphotericin B was more effective in reducing the number of infected cells, by 67.1 % and 49.0 % at 0.5 $\mu\text{g/mL}$ and 0.17 $\mu\text{g/mL}$, respectively, corroborating with de Mello and collaborators [54].

3.5. DCMF inhibits *L. infantum* multiplication in macrophages

Considering the substantial reduction in the number of parasites observed in the invasion assays, multiplication assays were also conducted, in which infected macrophages were treated with the same DCMF concentrations, but for different periods of time (24 h, 48 h, 72 h, and 96 h). The findings indicate that DCMF was able to reduce parasite multiplication within macrophages ($p < 0.0001$) in a concentration-dependent manner, significantly higher at the two highest concentrations (Fig. 5A), although no differences between treatment times were

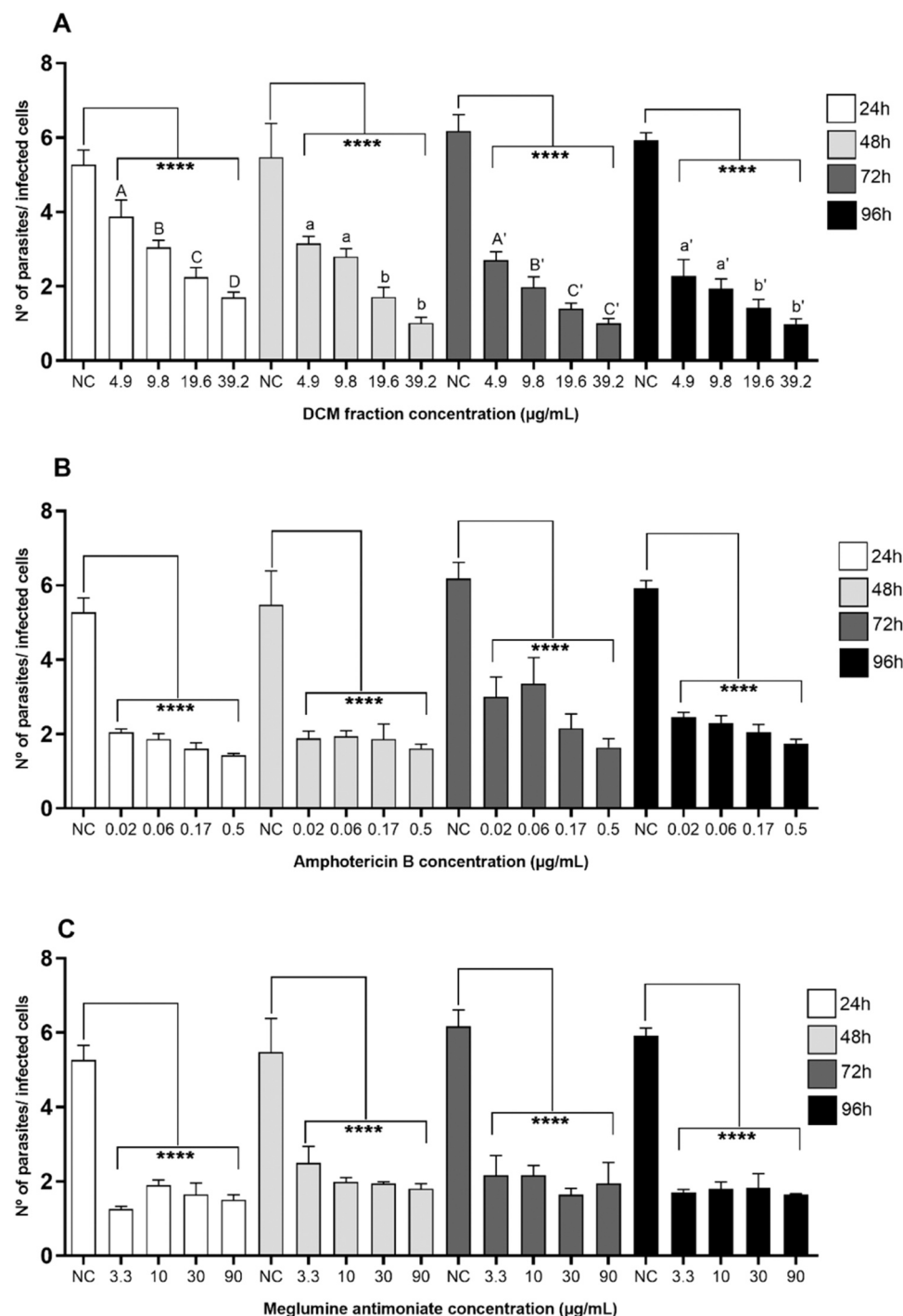


Fig. 5. Number of amastigotes internalized in macrophages (RAW 264.7) infected with *L. infantum* and treated with A) DCM fraction B) amphotericin B and C) meglumine antimoniate for different concentrations and hours. NC: negative control. ****statistically significant differences between the treatment groups and NC. Absence or the same letters represents no differences between groups. Divergent letters represent differences between groups.

observed. Both control antileishmanial drugs also inhibited parasite replication at all concentrations and treatment duration (Fig. 5B and 5C).

3.6. Docking results

Triosephosphate isomerase (TIM) is a highly conserved enzyme found in almost all organisms that catalyzes the conversion of dihydroxyacetone phosphate (DHAP) to glyceraldehyde-3-phosphate (G3P) in the glycolytic pathway [22]. Its inhibition can disrupt the glycolytic pathway, leading to ATP depletion and, ultimately, the death of the protozoan parasites [23,24]. It is important to note that TIM has the peculiarity of exhibiting high catalytic rates only in its dimeric form [55].

Previous computational studies have demonstrated that flavonoids and other natural products can inhibit *Leishmania* TIM activity and, therefore, may comprise potential *Leishmania* growth inhibitors [25–27, 56]. Also, the dimeric structure of brachydins may potentially enhance their inhibitory activity against *Leishmania* TIM compared to monomeric flavonoids, such as luteolin and quercetin [18,57]. This provides a rationale for investigating the potential inhibitory effects of DCMF on TIM. However, it is important to note that while TIM is a promising target, parasites may also have additional vulnerabilities, and a multi-target approach may be necessary for effective parasite control. While there is evidence of flavonoids downregulating the TIM expression *in vivo* [58], the effect of plant flavonoids on the inhibition effectiveness of TIM enzymes remains an underexplored area of research.

Our docking results indicate two main possibilities for the molecular binding of brachyidin compounds A (1), B (2), and C (3) to *Leishmania infantum* TIM (*li*TIM) (Figure S1–S2). The first potential region involved in brachyidin binding is located at the interface between subunits A and B of the homodimer. The side chains of Arg99 and Asp116 are involved in the hydrogen bond interactions with the O6 and O5 atoms of the compounds and the Tyr102, Tyr103, Phe75, and Glu98 residues stabilize the contacts at the inhibitor D ring (Figure S1). In addition, the hydrophobic Tyr103 rings from the A and B subunits form a stacking interaction with the investigated brachydins. Moreover, compound 1 is also stabilized by residues Ala70, Lys113, Lys71, Glu98, and Glu105. Glu105, which occurs in alternate conformations in many TIM structures with an unliganded interface, selectively adopts one of the conformations, facilitating ligand binding at the interface [59]. The binding pocket occurs towards the outer portion of the interface (Figure S1).

These results are in agreement with previous studies that demonstrate the effectiveness of targeting the *T. cruzi* TIM dimer interface with small molecules to selectively kill the parasite [60,61]. These observations support the theoretical finding that brachyidin binding to the dimer interface could induce conformational dimer changes and suggest that targeting the dimer interface of oligomeric enzymes with flavonoids could be a viable strategy for drug discovery.

The second possible binding region involves the flexible Loop-6 (residues 168–180) and Loop-7 (residues 212–216), a region that closes on substrate binding (Figure S2) [62]. The catalytic glutamate Glu98 is located at the beginning of Loop-6, comprising the catalytic base of the *li*TIM, which abstracts the proton from the substrate, generating the enediolate intermediate (Figure S2). Similar results were observed for *lb*TIM (Supporting information, Figure S3–S4). These results corroborate previous studies, such as the crystal structure description of TIM obtained from *Entamoeba histolytica*, which revealed a flexible Loop-6 region that closes upon substrate binding and is conserved in several organisms [63–65]. Thus, the docking results indicate two potential binding sites for brachydins involved in dimer interface stabilization at the catalytic *li*TIM site. The study of these interactions could result in the proposal of new and more active ligands that inhibit *li*TIM.

3.6.1. MD simulation results

Based on the structures obtained from the docking study, 10 ns of MD simulations were performed for all three compounds in the two positions to better evaluate interactions between the investigated compounds at different binding sites.

The *li*TIM structure complexed with compounds 1, 2, and 3 at the dimer interface indicated average RMSD values of 1.4 ± 0.1 Å, 1.2 ± 0.1 Å, and 1.4 ± 0.4 Å, respectively. At the catalytic site, RMSD values of 1.6 ± 0.3 Å, 1.8 ± 0.3 Å, and 1.6 ± 0.3 Å were observed for compounds 2 and 3, respectively (Figure S5 and Table S1). Overall, the investigated brachyidin compounds exhibited better stabilization at the dimer interface, especially Compound 2, which displayed better stability over time in this position. It is interesting to note that a previous *in vitro* study concerning these compounds demonstrated that brachyidin Compound 2 exhibits the ability to induce cell lesions that progress to parasitic *Leishmania* death [18].

After 10 ns of MD Simulations, Compound 3 destabilized over time at the dimer interface, presenting a loss of hydrogen bond and hydrophobic interactions (Figure S6). In contrast, compounds 1 and 2 exhibited accommodation at the interface, not only maintaining a very stable hydrogen bond with Asp116 but also gaining two more with the side chain of the Asn67 residue and other interactions with Glu78, Thr76, Phe75, and Ala70. Fig. 6 depicts the *li*TIM binding modes when complexed with brachyidin 2 and the molecular interactions obtained by MD Simulations.

The docking results concerning the compounds located near the catalytic site indicate the same initial interaction destabilization for Compound 1. Compound 3 displayed accommodation with Tyr102 and Lys14, forming hydrogen bond interactions with the O5 atom and Lys71, Ala74, Glu98, Ile173, and Gly174, also stabilizing the complex (Figure S7).

The binding free energies (ΔG) of the natural compounds and crystallographic inhibitors were estimated through the MM-GBSA method (Table 2). The energy calculations indicated that, although brachydins exhibit similar affinities at both binding sites, they display higher affinity for the *li*TIM dimer interface (Table 2). This may explain the observed interaction destabilization during the MD simulations when compared to the docking results. It is important to note that further computational and experimental studies are required to better evaluate brachyidin interactions and affinities for *li*TIM. Computational *lb*TIM results were also carried out and are displayed in the Supporting information (Table S2).

Compound 1 was demonstrated to be an inadequate candidate for leishmanicidal activity due to its higher RMSD values and weaker interactions at the dimer interface and catalytic site of *li*TIM throughout the simulation time, indicating a less stable compound resulting in lower efficacy. Compounds 2 and 3, on the other hand, demonstrated a similarly intriguing combination of stable interactions at the dimer interface and at the catalytic site. Brachyidin B demonstrated greater long-term stability in both positions, which may be attributed to its ability to induce cell lesions that lead to parasitic *Leishmania* death [18]. The MMGBSA results also indicate that brachyidin B exhibits higher binding energies than brachyidin C, supporting its potential as a better anti-leishmanial candidate. The results found for the DCMF in the present research show that the fraction is as efficient as brachyidin B when isolated. This is a very important finding because isolating the compound depends on several steps and comes at a very high cost, while obtaining DCMF is a simple and low-cost process.

In future research, a broader examination of potential targets within the parasites, along with a thorough investigation of DCMF's fraction with these targets, will be crucial for a more comprehensive understanding of the mechanism of action of natural products and their potential as anti-parasitic agents. Additionally, further studies can elucidate whether compounds 1, 2, and 3 have selectivity for TIM compared to other potential targets, ultimately contributing to the development of novel anti-parasitic strategies.

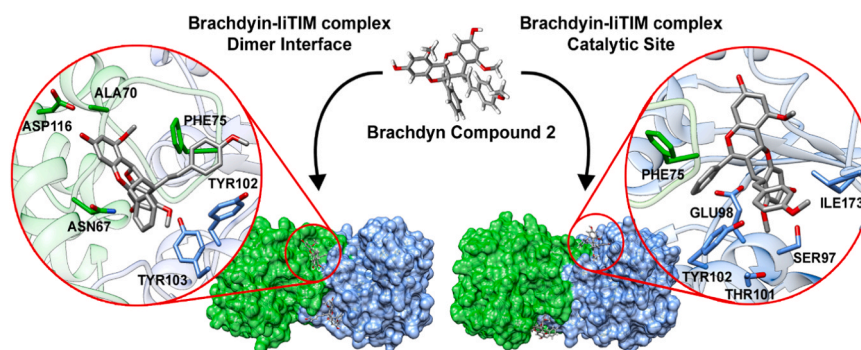


Fig. 6. Surface map for the protein, where the highlighted region indicates the brachdyn binding cavity at the A) dimer interface. B) catalytic site. Subsite A of *liTIM* in blue; Subsite B of *liTIM* in green. Hydrogens were hidden for better visualization.

Table 2

Binding free energies of the brachdyn compounds.

	ΔG_{GBSA} (kcal.mol ⁻¹)	
Compounds	Dimer Interface	Active Site
Brachdyn A (1)	-36.4 ± 3.4	-13.9 ± 2.4
Brachdyn B (2)	-37.9 ± 2.7	-14.5 ± 3.7
Brachdyn C (3)	-27.8 ± 2.0	-7.5 ± 1.7

4. Conclusion

The DCMF containing brachydins A, B, and C exhibits *in vitro* anti-leishmanial activity against *L. infantum*, *L. braziliensis*, and *L. mexicana* promastigotes, as well as against *L. infantum* amastigotes. Additionally, this fraction significantly reduces the number of infected macrophages and internalized amastigotes. Furthermore, *in vitro* assays suggest that brachydins act by disrupting cell membranes rather than causing DNA damage. The computational analysis applied verified two binding modes of brachydins to the TIM enzyme, one located near the catalytic site and the other at the homodimer interface. Moreover, the Tyr103, Asn68, and Asp117 residues are crucial for complex stabilization and hydrogen bond interactions with compounds 1 and 2, which were the most stable during the MD simulation and MMGBSA calculations. Our computational results shed new light on TIM dynamics and brachdyn compound mechanisms of action, contributing to the design of more potent leishmaniasis inhibitors.

Based on all the results, DCMF may emerge as a possible candidate sourced from nature for the development of a novel, safer leishmaniasis treatment. A further comprehensive investigation is required to determine whether this fraction directly affects parasite structures or activates the innate defense mechanisms of macrophages, such as nitric oxide production or redox potential modification. Consequently, this could potentially lead to the disruption of parasitic structures or to the inhibition of protein synthesis within the parasite.

CRedit authorship contribution statement

Cláudia Quintino da Rocha: Writing – review & editing, Writing – original draft, Validation, Resources, Project administration, Methodology, Investigation, Funding acquisition, Formal analysis, Conceptualization. **Silma Pereira:** Writing – review & editing, Writing – original draft, Validation, Resources, Project administration, Methodology, Investigation, Funding acquisition, Formal analysis, Conceptualization. **Vera Maciel:** Validation, Methodology, Investigation. **Monica Neves:** Writing – original draft, Validation, Methodology, Investigation, Formal analysis. **Jessyane Nascimento:** Validation, Methodology, Investigation. **Mayara Ingrid S. Lima:** Validation, Methodology, Investigation. **Ana Jessica Coelho:** Validation, Methodology, Investigation. **Alberto Santos:** Validation, Methodology, Investigation. **Jaldyr Varela Júnior:**

Validation, Methodology, Investigation.

Declaration of Competing Interest

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

Acknowledgements

This study was financed in part by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Finance Code 001, PROCAD-AM [88887.472618/2019-00 (CQR)] and FAPEMA [INFRA-02263/21 (CQR)].

Appendix A. Supporting information

Supplementary data associated with this article can be found in the online version at doi:10.1016/j.molbiopara.2024.111629.

References

- [1] World Health Organization (WHO). (2022). Leishmaniasis. Fact Sheets. (<https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/leishmaniasis>) Accessed 06 Dez 2022.
- [2] Brasil Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância das Doenças Transmissíveis. (2017). Manual de vigilância da leishmaniose tegumentar [recurso eletrônico] (2 ed.). (http://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/manual_vigilancia_leishmaniose) Accessed 03 Dez 2022.
- [3] C.D. Comandoli-Wyrepkowski, A. da C. Paz, B.B. Jensen, A.M.R. Franco, Pharmacological aspects of drug therapy used for cutaneous leishmaniasis: a literature review, Electron. J. Collec. Health 12 (8) (2020) 1–10, <https://doi.org/10.25248/reas.e3352.2020>.
- [4] M.I.S. Lima, V.O. Arruda, E.V.C. Alves, A.P.S. de Azevedo, S.G. Monteiro, S.R. F. Pereira, Genotoxic effects of the antileishmanial drug glucantime®, Arch. Toxicol. 84 (3) (2010) 227–232, <https://doi.org/10.1007/s00204-009-0485-0>.
- [5] S. Rijal, B. Ostyn, S. Uranw, K. Rai, N.R. Bhattarai, T.P.C. Dorlo, J.H. Beijnen, M. Vanaerschoot, S. Decuypere, S.S. Dhakal, M.L. Das, P. Karki, R. Singh, M. Boelaert, J.C. Dujardin, Increasing failure of miltefosine in the treatment of kala-azar in nepal and the potential role of parasite drug resistance, reinfection, or noncompliance, Clin. Infect. Dis. 56 (11) (2013) 1530–1538, <https://doi.org/10.1093/cid/cit102>.
- [6] P.V. Castelo Branco, R.-E.P. Soares, L.C.L. de Jesus, V.R. Moreira, H.J. Alves, M. R. de Castro Belfort, V.L.M. Silva, S.R. Ferreira Pereira, The antileishmanial drug miltefosine (Impavido®) causes oxidation of DNA bases, apoptosis, and necrosis in mammalian cells, Mutat. Res. - Genet. Toxicol. Environ. Mutagen. 806 (2016) 34–39, <https://doi.org/10.1016/j.mrgentox.2016.06.007>.
- [7] P.V. Castelo-Branco, H.J. Alves, R.L. Pontes, V.L. Maciel-Silva, S.R. Ferreira Pereira, Ascorbic acid reduces the genetic damage caused by miltefosine (hexadecylphosphocholine) in animals infected by Leishmania (Leishmania) infantum without decreasing its antileishmanial activity, Int. J. Parasitol.: Drugs Drug Resist. 9 (2019) 8–15, <https://doi.org/10.1016/j.ijpddr.2018.12.002>.
- [8] G.A.S. Romero, D.L. Costa, C.H.N. Costa, R.P. de Almeida, E.V. de Melo, S.F.G. de Carvalho, A. Rabello, A.L. de Carvalho, A. Sousa, Q. de, R.D. Leite, S.S. Lima, T. A. Amaral, F.P. Alves, J. Rode, Efficacy and safety of available treatments for visceral leishmaniasis in Brazil: a multicenter, randomized, open label trial, PLoS Negl. Trop. Dis. 11 (6) (2017) 1–25, <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0005706>.

- [9] R.C.R. da Silva, L.N.P.D. Cruz, J.M. da S. Coutinho, C.E. Fonseca-Alves, J.M. M. Rebêlo, S.R.F. Pereira, Experimental transmission of *Leishmania* (Leishmania) amazonensis to immunosuppressed mice through the bite of *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae) results in cutaneous leishmaniasis, *Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo* 63 (2021) 1–10, <https://doi.org/10.1590/S1678-9946202163081>.
- [10] O.P. Singh, S. Sundar, Immunotherapy and targeted therapies in treatment of visceral leishmaniasis: current status and future prospects, *Front. Immunol.* 5 (6) (2014) 1–9.
- [11] P.C. Lima, M.G. dos Santos, K.D.S. Calabrese, A.L. Abreu Silva, F. Almeida, Avaliação da capacidade leishmanicida de espécies vegetais do cerrado, *Rer. Patol. Trop.* 44 (1) (2015) 45–55, <https://doi.org/10.5216/rpt.v44i1.34800>.
- [12] C.Q. da Rocha, F.C. Vilela, G.P. Cavalcante, F. v Santa-Cecília, L. Santos-E-Silva, M. H. dos Santos, A. Giusti-Paiva, Anti-inflammatory and antinociceptive effects of *Arrabidaea brachypoda* (DC.) Bureau roots, *J. Ethnopharmacol.* 133 (2) (2011) 396–401, <https://doi.org/10.1016/j.jep.2010.10.009>.
- [13] C.Q. da Rocha, F.C. Vilela, F. v Santa-Cecília, G.P. Cavalcante, W. Vilegas, A. Giusti-Paiva, M.H. dos Santos, Oleanane-type triterpenoid: An anti-inflammatory compound of the roots *Arrabidaea brachypoda*, *Rer. Bras. Pharmacogn.* 25 (3) (2015) 228–232, <https://doi.org/10.1016/j.bjp.2015.03.005>.
- [14] T. Alcerito, F.E. Barbo, G. Negri, D.Y.A.C. Santos, C.I. Meda, M. Cláudia, M. Young, D. Chávez, C.T.T. Blatt, Foliar epicuticular wax of *Arrabidaea brachypoda*: flavonoids and antifungal activity, *Biochem. Syst. Ecol.* 30 (7) (2002) 677–683, [https://doi.org/10.1016/S0305-1978\(01\)00149-1](https://doi.org/10.1016/S0305-1978(01)00149-1).
- [15] G.C. Brandão, E.G. Kroon, J.R. dos Santos, J.R. Stehmann, J.A. Lombardi, A. Braga De Oliveira, Antiviral activity of Bignoniaceae species occurring in the state of Minas Gerais (Brazil): Part 1, *Lett. Appl. Microbiol.* 51 (4) (2010) 469–476, <https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.2010.02924.x>.
- [16] L.M. de Sousa Andrade, A.B.M. de Oliveira, A.L.A.B. Leal, F.A. de Alcântara Oliveira, A.L. Portela, J. de Sousa Lima Neto, J.P. de Siqueira-Júnior, G.W. Kaatz, C.Q. da Rocha, H.M. Barreto, Antimicrobial activity and inhibition of the NorA efflux pump of *Staphylococcus aureus* by extract and isolated compounds from *Arrabidaea brachypoda*, *Microb. Pathog.* 140 (2020) 1–7, <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2019.103935>.
- [17] C.Q. da Rocha, E.F. Queiroz, C.S. Meira, D.R.M. Moreira, M.B.P. Soares, L. Marcourt, W. Vilegas, J.L. Wolfender, Dimeric flavonoids from *Arrabidaea brachypoda* and assessment of their anti- *Trypanosoma cruzi* activity, *J. Nat. Prod.* 77 (6) (2014) 1345–1350, <https://doi.org/10.1021/np401060j>.
- [18] V.P.C. Rocha, C.Q. da Rocha, E.F. Queiroz, L. Marcourt, W. Vilegas, G.B. Grimaldi, P. Furrer, E. Allémann, J.L. Wolfender, M.B.P. Soares, Antileishmanial activity of dimeric flavonoids isolated from *Arrabidaea brachypoda*, *Mol* 24 (1) (2019) 1–13, <https://doi.org/10.3390/molecules24010001>.
- [19] V.L. Maciel-Silva, C.Q. da Rocha, L.M.R. Alencar, P.V. Castelo-Branco, I.H. Sousa, A.P. de, Azevedo-Santos, A.A.M. Vale, S.G. Monteiro, R.-E.P. Soares, S.J. A. Guimarães, J.R. do Nascimento, S.R.F. Pereira, Unusual dimeric flavonoids (brachydins) induce ultrastructural membrane alterations associated with antitumor activity in cancer cell lines, *Drug Chem. Toxicol.* 29 (2022) 1–12, <https://doi.org/10.1080/01480545.2022.2080217>.
- [20] C.A. de Lima, M.C.Z. Cubero, Y.E.M. Franco, C.D.P. Rodrigues, J.R. do Nascimento, D.B. Vendramini-Costa, J.M. Sciani, C.Q. da Rocha, G.B. Longato, Antiproliferative Activity of Two Unusual Dimeric Flavonoids, Brachyidin E and Brachyidin F, Isolated from *Fridericia platyphylla* (Cham.) L.G.Lohmann: *In Vitro* and Molecular Docking Evaluation, *BioMed. Res. Int.* 2022 (2022) 1–12, <https://doi.org/10.1155/2022/3319203>.
- [21] H.L. Nunes, K. Tutts, J.M. Serpeloni, J.R. do Nascimento, C.Q. da Rocha, V.A. O. Silva, A. van H. Lengert, R.M. Reis, I.M. de Syllos Cólus, Characterization of the in vitro cytotoxic effects of brachydins isolated from *Fridericia platyphylla* in a prostate cancer cell line, *J. Toxicol. Environ. Health Part A* 83 (15–16) (2020) 547–558, <https://doi.org/10.1080/15287394.2020.1784339>.
- [22] T.D. Myers, M.J. Palladino, Newly discovered roles of triosephosphate isomerase including functions within the nucleus, *Mol. Med.* 29 (1) (2023) 18, <https://doi.org/10.1186/s10020-023-00612-x>.
- [23] L. Saramago, H. Gomes, E. Aguilera, H. Cerecetto, M. González, M. Cabrera, M. Alzugaray, I. da Silva Vaz Junior, R. Nunes da Fonseca, B. Aguirre-López, N. Cabrera, R. Pérez-Montfort, A. Merlino, J. Moraes, G. Álvarez, Novel and Selective Rhipicephalus microplus Triosephosphate Isomerase Inhibitors with Acaricidal Activity, *Vet. Sci.* 5 (3) (2018) 74, <https://doi.org/10.3390/vetsci5030074>.
- [24] A. Juárez-Saldivar, E. Barbosa-Cabrera, E.E. Lara-Ramírez, A.D. Paz-González, A. v Martínez-Vázquez, V. Bocanegra-García, I. Palos, N.E. Campillo, G. Rivera, Virtual Screening of FDA-Approved Drugs against Triose Phosphate Isomerase from *Entamoeba histolytica* and *Giardia lamblia* Identifies Inhibitors of Their Trophozoite Growth Phase, *Int. J. Mol. Sci.* 22 (11) (2021) 5943, <https://doi.org/10.3390/ijms22115943>.
- [25] A. Juárez-Saldivar, M. Schroeder, S. Salentin, V.J. Haupt, E. Saavedra, C. Vázquez, F. Reyes-Espinoza, V. Herrera-Mayorga, J.C. Villalobos-Rocha, C.A. García-Pérez, N.E. Campillo, G. Rivera, Computational drug repositioning for chagas disease using protein-ligand interaction profiling, *Int. J. Mol. Sci.* 21 (12) (2020) 4270, <https://doi.org/10.3390/ijms21124270>.
- [26] N. Malak, B.S. Alotaibi, A. Khan, A. Khan, S. Ullah, N. Nasreen, S. Niaz, C.-C. Chen, Density functional theory calculations and molecular docking analyses of flavonoids for their possible application against the acetylcholinesterase and triosephosphate isomerase proteins of *Rhipicephalus microplus*, *Molecules* 28 (8) (2023) 3606, <https://doi.org/10.3390/molecules28083606>.
- [27] L.D. González-Morales, A. Moreno-Rodríguez, L.K. Vázquez-Jiménez, T. Delgado-Maldonado, A. Juárez-Saldivar, E. Ortiz-Pérez, A.D. Paz-Gonzalez, E.E. Lara-Ramírez, L. Yépez-Mulia, P. Meza, G. Rivera, Triose phosphate isomerase structure-based virtual screening and in vitro biological activity of natural products as *Leishmania mexicana* inhibitors, *Pharmaceutics* 15 (8) (2023) 2046, <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics15082046>.
- [28] T. Mossman, Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays, *J. Immunol. Methods* 65 (1–2) (1983) 55–63, [https://doi.org/10.1016/0022-1759\(83\)90303-4](https://doi.org/10.1016/0022-1759(83)90303-4).
- [29] A.G. Tempone, Targeting *Leishmania* (L.) chagasi amastigotes through macrophage scavenger receptors: the use of drugs entrapped in liposomes containing phosphatidylserine, *J. Antimicrob. Chemother.* 54 (1) (2004) 60–68, <https://doi.org/10.1093/jac/dkh281>.
- [30] J.A. Makwali, F.M.E. Wanja, J. Ingonga, C.O. Anjili, In vitro studies on the antileishmanial activity of herbicides and plant extracts against leishmania major parasites, *Res. J. Med. Plant* 9 (3) (2015) 90–104, <https://doi.org/10.3923/rjmp.2015.90.104>.
- [31] N.P. Singh, M.T. McCoy, R.R. Tice, E.L. Schneider, A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells, *Exp. Cell Res.* 175 (1) (1988) 184–191, [https://doi.org/10.1016/0014-4827\(88\)90265-0](https://doi.org/10.1016/0014-4827(88)90265-0).
- [32] R.R. Tice, E. Agurell, D. Anderson, B. Burlinson, A. Hartmann, H. Kobayashi, Y. Miyamae, E. Rojas, J.-C. Ryu, Y.F. Sasaki, Single cell gel/comet assay: Guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing, *Environ. Mol. Mutagen.* 35 (3) (2000) 206–221, [https://doi.org/10.1002/\(sici\)1098-2280\(2000\)35:3<206::aid-em8>3.0.co;2-j](https://doi.org/10.1002/(sici)1098-2280(2000)35:3<206::aid-em8>3.0.co;2-j).
- [33] I. Ramírez-Macías, C. Marín, R. Chahboun, F. Olmo, I. Messouri, O. Huertas, M. J. Rosales, R. Gutierrez-Sánchez, E. Alvarez-Manzaneda, M. Sánchez-Moreno, In vitro evaluation of new terpenoid derivatives against *Leishmania infantum* and *Leishmania braziliensis*, *Memórias Do Instituto Oswaldo Cruz* 107 (3) (2012) 370–376, <https://doi.org/10.1590/s0074-02762012000300012>.
- [34] R. Venkatesan, M. Alahuhta, P.M. Pihko, R.K. Wierenga, High resolution crystal structures of triosephosphate isomerase complexed with its suicide inhibitors: The conformational flexibility of the catalytic glutamate in its closed, liganded active site, *Protein Sci.* 20 (8) (2011) 1387–1397, <https://doi.org/10.1002/pro.667>.
- [35] E. Krieger, S.B. Nabuurs, G. Vriend, Homology Modeling. *Structural Bioinformatics*, John Wiley & Sons, Inc, 2003, pp. 509–523.
- [36] A. Fiser, A. Sali, Modeller: generation and refinement of homology-based protein structure models, *Methods Enzymol.* 374 (2003) 461–491, [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(03\)74020-8](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(03)74020-8).
- [37] D.A. Case, T.E. Cheatham, T. Darden, H. Gohlke, R. Luo, K.M. Merz, A. Onufriev, C. Simmerling, B. Wang, R.J. Woods, The Amber biomolecular simulation programs, *J. Comput. Chem.* 26 (16) (2005) 1668–1688, <https://doi.org/10.1002/jcc.20290>.
- [38] E. Jurrus, D. Engel, K. Star, K. Monson, J. Brandi, L.E. Felberg, D.H. Brookes, L. Wilson, J. Chen, K. Liles, M. Chun, P. Li, D.W. Gohara, T. Dolinsky, R. Konecny, D.R. Koes, J.E. Nielsen, T. Head-Gordon, W. Geng, N.A. Baker, Improvements to the APBS biomolecular solvation software suite, *Protein Sci.* 27 (1) (2018) 112–128, <https://doi.org/10.1002/pro.3280>.
- [39] D. Schneidman-Duhovny, Y. Inbar, R. Nussinov, H.J. Wolfson, PatchDock and SymmDock: servers for rigid and symmetric docking, *Nucleic Acids Res* 33 (2005) 363–367, <https://doi.org/10.1093/nar/gki481>.
- [40] R.A. Laskowski, J. Jablonska, L. Pravda, R.S. Vařeková, J.M. Thornton, PDBsum: Structural summaries of PDB entries, *Protein Sci.* 27 (1) (2018) 129–134, <https://doi.org/10.1002/pro.3289>.
- [41] P. Mark, L. Nilsson, Structure and Dynamics of the TIP3P, SPC, and SPC/E Water Models at 298 K, *J. Phys. Chem. A* 105 (43) (2001) 9954–9960, <https://doi.org/10.1021/jp003020w>.
- [42] B. Roux, M. Nina, R. Pomès, J.C. Smith, Thermodynamic stability of water molecules in the bacteriorhodopsin proton channel: a molecular dynamics free energy perturbation study, *Biophys. J.* 71 (2) (1996) 670–681, [https://doi.org/10.1016/S0006-3495\(96\)79267-6](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(96)79267-6).
- [43] C. Salgado, H. Morin, N. Coriolano de Aquino, L. Neff, C. Quintino da Rocha, W. Vilegas, L. Marcourt, J.-L. Wolfender, O. Jordan, E. Ferreira Queiroz, E. Allémann, In Vitro Anti-Inflammatory Activity in Arthritic Synoviocytes of *A. brachypoda* Root Extracts and Its Unusual Dimeric Flavonoids, *Mol* 25 (2020) 5219, <https://doi.org/10.3390/molecules25215219>.
- [44] Y. Carvalho, S. Shanmugam, M.S. Batista, M.R. Serafini, A.A.D.S. Araújo, L. J. Quintans Júnior, Pharmaceutical agents for treatment of leishmaniasis: a patent landscape, *Expert Opin. Ther. Pat.* 30 (8) (2020) 633–641, <https://doi.org/10.1080/13543776.2020.1789100>.
- [45] C.D.C. Wyrepkowski, C.D.C. Wyrepkowski, A. da C. Paz, B.B. Jensen, A.M. R. Franco, Aspectos farmacológicos da terapia medicamentosa utilizada para a leishmaniose cutânea: uma revisão de literatura, *Rev. Eletr. Acervo Saúde* 12 (8) (2020) 33–52, <https://doi.org/10.25248/reas.e3352.2020>.
- [46] G. Morizot, R. Jouffroy, A. Faye, P. Chabert, K. Belhouari, R. Calin, C. Charlier, P. Mialhes, J.-Y. Siriez, O. Mouri, H. Yera, J. Gilquin, R. Tubiana, F. Lantermier, M.-F. Mamzer, C. Legendre, D. Peyramond, E. Caumes, O. Lortholary, P. Buffet, Antimony to cure visceral leishmaniasis unresponsive to liposomal Amphotericin B, *PLoS Negl. Trop. Dis.* 10 (1) (2016) 1–6, <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0004304>.
- [47] S. Pradhan, R.A. Schwartz, A. Patil, S. Grabbe, M. Goldust, Treatment options for leishmaniasis, *Clin. Exp. Dermatol.* 47 (3) (2022) 516–521, <https://doi.org/10.1111/ced.14919>.
- [48] J. de P. Carvalho, T.M. de Assis, T.C. Simões, G. Cota, Estimating direct costs of the treatment for mucosal leishmaniasis in Brazil, *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 54 (2021) 1–9, <https://doi.org/10.1590/0037-8682-0454-2020>.
- [49] S. Mistro, B. Gomes, L. Rosa, L. Miranda, M. Camargo, R. Badaró, Cost-effectiveness of liposomal amphotericin B in hospitalised patients with mucocutaneous

- leishmaniasis, *Trop. Med. Int. Health* 22 (12) (2017) 1569–1578, <https://doi.org/10.1111/tmi.12996>.
- [50] I. Pereira, C.Q. da Rocha, I.A. Rosa, A.T. Mendonça, W. Vilegas, L.V.S. do Sacramento, M.J. Marques, Leishmanicidal activity of different parts from *Arrabidaea brachypoda* (DC.) Bureau (Bignoniaceae), *Rev. Iniciaç. Cient. Univ. Val. Rio Verde* 10 (1) (2012) 49–55, <https://doi.org/10.5892/ruvrv.2012.101.4955>.
- [51] F.A. Resende, C.H. Nogueira, L.G. Espanha, P.K. Boldrin, A.P. Oliveira-Höhne, M. Santoro de Camargo, C. Quintino da Rocha, W. Vilegas, E.A. Varanda, In vitro toxicological assessment of *Arrabidaea brachypoda* (DC.) Bureau: mutagenicity and estrogenicity studies, *Regul. Toxicol. Pharmacol.* 90 (2017) 29–35, <https://doi.org/10.1016/j.yrtph.2017.08.010>.
- [52] V.R. Moreira, L.C.L. de Jesus, R.-E.P. Soares, L.D.M. Silva, B.A.S. Pinto, M.N. Melo, A.M. Paes, A. de, S.R.F. Pereira, Meglumine Antimoniate (Glucantime) Causes Oxidative Stress-Derived DNA Damage in BALB/c Mice Infected by *Leishmania* (*Leishmania*) infantum, *Antimicrob. Agents Chemother.* 61 (6) (2017) 1–10, <https://doi.org/10.1128/AAC.02360-16>.
- [53] L.C.M. Egitto, S.R. Batistuzzo de Medeiros, M.G. Medeiros, J.C. Price, E.S.T. Egitto, Evaluation of the relationship of the molecular aggregation state of amphotericin B in medium to its genotoxic potential, *J. Pharm. Sci.* 93 (6) (2004) 1557–1565, <https://doi.org/10.1002/jps.20038>.
- [54] T.F.P. de Mello, H.R. Bitencourt, R.B. Pedroso, S.M.A. Aristides, M.V.C. Lonardoni, T.G.V. Silva, Leishmanicidal activity of synthetic chalcones in *Leishmania* (*Viannia*) *braziliensis*, *Exp. Parasitol.* 136 (2014) 27–34, <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2013.11.003>.
- [55] V. Zomosa-Signoret, G. Hernández-Alcántara, H. Reyes-Vivas, E. Martínez-Martínez, G. Garza-Ramos, R. Pérez-Montfort, M. Tuena de Gómez-Puyou, A. Gómez-Puyou, Control of the reactivation kinetics of homodimeric triosephosphate isomerase from unfolded monomers, *Biochem* 42 (11) (2003) 3311–3318, <https://doi.org/10.1021/bi0206560>.
- [56] L.K. Vázquez-Jiménez, A. Moreno-Herrera, A. Juárez-Saldivar, A. González-González, E. Ortiz-Pérez, A.D. Paz-González, I. Palos, E. Ramírez-Moreno, G. Rivera, Recent advances in the development of triose phosphate isomerase inhibitors as antiprotozoal agents, *Curr. Med. Chem.* 29 (14) (2022) 2504–2529, <https://doi.org/10.2174/0929867328666210913090928>.
- [57] I.L.K. Wong, K.-F. Chan, T.H. Chan, L.M.C. Chow, Flavonoid dimers as novel, potent antileishmanial agents, *J. Med. Chem.* 55 (20) (2012) 8891–8902, <https://doi.org/10.1021/jm301172v>.
- [58] K.-Y. Su, C.Y. Yu, Y.-W. Chen, Y.-T. Huang, C.-T. Chen, H.-F. Wu, Y.-L.S. Chen, Rutin, a Flavonoid and Principal Component of *Saussurea involucreata*, Attenuates Physical Fatigue in a Forced Swimming Mouse Model, *Int. J. Med. Sci.* 11 (5) (2014) 528–537, <https://doi.org/10.7150/ijms.8220>.
- [59] P. Gayathri, M. Banerjee, A. Vijayalakshmi, H. Balaran, P. Balaran, M.R. N. Murthy, Biochemical and structural characterization of residue 96 mutants of *Plasmodium falciparum* triosephosphate isomerase: active-site loop conformation, hydration and identification of a dimer-interface ligand-binding site, *Acta Crystallogr* 65 (8) (2009) 847–857, <https://doi.org/10.1107/S0907444909018666>.
- [60] V. Olivares-Illana, A. Rodríguez-Romero, I. Becker, M. Berzunza, J. García, R. Pérez-Montfort, N. Cabrera, F. López-Calahorra, M.T. de Gómez-Puyou, A. Gómez-Puyou, Perturbation of the Dimer Interface of Triosephosphate Isomerase and its Effect on *Trypanosoma cruzi*, *PLoS Negl. Trop. Dis.* 1 (1) (2007) e1, <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0000001>.
- [61] A. Téllez-Valencia, V. Olivares-Illana, A. Hernández-Santoyo, R. Pérez-Montfort, M. Costas, A. Rodríguez-Romero, F. López-Calahorra, M. Tuena de Gómez-Puyou, A. Gómez-Puyou, Inactivation of Triosephosphate Isomerase from *Trypanosoma cruzi* by an Agent that Perturbs its Dimer Interface, *J. Mol. Biol.* 341 (5) (2004) 1355–1365, <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2004.06.056>.
- [62] M.G. Casteleijn, M. Alahuhta, K. Groebel, I. El-Sayed, K. Augustyns, A.-M. Lambeir, P. Neubauer, R.K. Wierenga, Functional Role of the Conserved Active Site Proline of Triosephosphate Isomerase, *Biochem* 45 (51) (2006) 15483–15494, <https://doi.org/10.1021/bi061683j>.
- [63] A. Rodríguez-Romero, A. Hernández-Santoyo, L. del Pozo Yauner, A. Kornhauser, D.A. Fernández-Velasco, Structure and Inactivation of Triosephosphate Isomerase from *Entamoeba histolytica*, *J. Mol. Biol.* 322 (4) (2002) 669–675, [https://doi.org/10.1016/S0022-2836\(02\)00809-4](https://doi.org/10.1016/S0022-2836(02)00809-4).
- [64] Q. Liao, Y. Kulkarni, U. Sengupta, D. Petrović, A.J. Mulholland, M.W. van der Kamp, B. Strodel, S.C.L. Kamerlin, Loop motion in triosephosphate isomerase is not a simple open and shut case, *J. Am. Chem. Soc.* 140 (46) (2018) 15889–15903, <https://doi.org/10.1021/jacs.8b09378>.
- [65] A.R. Katebi, R.L. Jernigan, The critical role of the loops of triosephosphate isomerase for its oligomerization, dynamics, and functionality, *Protein Sci.* 23 (2) (2014) 213–228, <https://doi.org/10.1002/pro.2407>.

Article

Zein Nanoparticles-Loaded Flavonoids-Rich Fraction from *Fridericia platyphylla*: Potential Antileishmanial Applications

Monica Araujo das Neves ¹, Caroline Martins de Jesus ², Jhones Luiz de Oliveira ³, Samuel dos Santos Soares Buna ¹, Lucilene Amorim Silva ², Leonardo Fernandes Fraceto ³ and Cláudia Quintino da Rocha ^{1,*}

¹ PostGraduate Program in Chemistry, Center for Exact Sciences and Technology (CCET), UFMA-Federal University of Maranhão, São Luís 65080-805, Brazil; monica.neves@ufma.br (M.A.d.N.); samuel.buna@discente.ufma.br (S.d.S.S.B.)

² PostGraduate Program in Health Sciences, Center for Biological and Health Sciences (CCBS), UFMA-Federal University of Maranhão, São Luís 65080-805, Brazil; caroline.mj@discente.ufma.br (C.M.d.J.); lucilene.silva@ufma.br (L.A.S.)

³ Department of Environmental Engineering, Institute of Science and Technology of Sorocaba, São Paulo State University (UNESP), Sorocaba 18087-180, Brazil; jhones.luiz@unesp.br (J.L.d.O.); leonardo.fraceto@unesp.br (L.F.F.)

* Correspondence: rocha.claudia@ufma.br

Abstract: Background/Objectives: Leishmaniasis, caused by protozoa of the genus *Leishmania*, is a major global health issue due to the limitations of current treatments, which include low efficacy, high costs, and severe side effects. This study aimed to develop a more effective and less toxic therapy by utilizing zein nanoparticles (ZNPs) in combination with a nonpolar fraction (DCMF) from *Fridericia platyphylla* (Syn. *Arrabidaea brachypoda*), a plant rich in dimeric flavonoids called brachydins. **Methods:** Zein nanoparticles were used as carriers to encapsulate DCMF. The system was characterized by measuring particle diameter, polydispersity index, zeta potential, and encapsulation efficiency. Analytical techniques such as FTIR, DSC, and AFM were employed to confirm the encapsulation and stability of DCMF. Antileishmanial activity was assessed against *Leishmania amazonensis* promastigotes and amastigotes, while cytotoxicity was tested on RAW264.7 macrophages. **Results:** The ZNP-DCMF system exhibited favorable properties, including a particle diameter of 141 nm, a polydispersity index below 0.2, and a zeta potential of 11.3 mV. DCMF was encapsulated with an efficiency of 94.6% and remained stable for 49 days. In antileishmanial assays, ZNP-DCMF inhibited the viability of promastigotes with an IC₅₀ of 36.33 µg/mL and amastigotes with an IC₅₀ of 0.72 µg/mL, demonstrating higher selectivity (SI = 694.44) compared to DCMF alone (SI = 43.11). ZNP-DCMF was non-cytotoxic to RAW264.7 macrophages, with a CC₅₀ > 500 µg/mL. **Conclusions:** Combining *F. platyphylla* DCMF with zein nanoparticles as a carrier presents a promising approach for leishmaniasis treatment, offering improved efficacy, reduced toxicity, and protection of bioactive compounds from degradation.

Keywords: neglected diseases; brachydins; polymeric nanoparticle; zein; leishmaniasis



Citation: Neves, M.A.d.; Jesus, C.M.d.; Oliveira, J.L.d.; Buna, S.d.S.S.; Silva, L.A.; Fraceto, L.F.; Rocha, C.Q.d. Zein Nanoparticles-Loaded Flavonoids-Rich Fraction from *Fridericia platyphylla*: Potential Antileishmanial Applications. *Pharmaceutics* **2024**, *16*, 1603. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics16121603>

Academic Editor: Sofia Lima

Received: 8 November 2024

Revised: 5 December 2024

Accepted: 13 December 2024

Published: 16 December 2024



Copyright: © 2024 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

1. Introduction

Leishmaniasis is a neglected zoonotic disease caused by protozoan parasites of the genus *Leishmania*. This disease presents diverse clinical manifestations and epidemiological variations, impacting various geographic regions and contributing significantly to global morbidity and mortality. It is recognized as one of the six priority endemic diseases worldwide [1]. Leishmaniasis occurs in three primary forms: visceral, cutaneous, and mucocutaneous, with the latter affecting the mucous membranes of the upper respiratory tract, leading to severe tissue damage in the nose, mouth, and throat, often resulting in disfigurement [2].

According to the World Health Organization (WHO), approximately 700,000 to 1 million new cases of leishmaniasis occur annually, with 20,000 to 30,000 deaths attributed to its visceral and cutaneous forms, underscoring its relevance as a global public health issue [2]. In Brazil, most cases are concentrated in the North and Northeast regions, disproportionately affecting rural and low-income populations [3].

Current therapeutic strategies rely on pentavalent antimonials (e.g., meglumine antimoniate and sodium stibogluconate) and non-antimonial drugs (e.g., pentamidine, amphotericin B, paromomycin, and miltefosine). However, their clinical use could be improved by significant limitations, including drug resistance, high toxicity, and severe side effects [4–7].

The search for alternative treatments has highlighted the potential of medicinal plants as a source of bioactive compounds for drug development. The chemical diversity of plant-derived oils, extracts, and fractions provides valuable candidates for antiparasitic therapies. Numerous studies have demonstrated the efficacy of natural products against *Leishmania* species in vitro and in vivo [8,9]. Among secondary metabolites, alkaloids, steroids, terpenes, coumarins, and flavonoids exhibit promising activity and selectivity against these parasites [10–12].

In this context, *Fridericia platyphylla* (Syn. *Arrabidaea brachypoda*), commonly referred to as “cervinha do campo” or “cipó-uma”, has emerged as a promising source of bioactive compounds. Phytochemical studies have identified a variety of secondary metabolites, including flavonoids, triterpenes, saponins, tannins, and polyphenols, in this species [13]. Traditionally, it has been used for the treatment of kidney stones and arthritis [14], while its antimicrobial [15], anti-inflammatory, antinociceptive properties [16], and activity against *Trypanosoma cruzi* [17] have also been reported. Additionally, its dichloromethane fraction (DCMF), containing dimeric flavonoids known as brachydins, has demonstrated antileishmanial [18] and antitumor activities [19–21].

Despite the potential of these plant-derived compounds, their application in therapeutics is constrained by challenges such as low water solubility, instability, and poor bioavailability, alongside potential side effects when they are used in their natural form [22]. Nanotechnology has emerged as a viable strategy to address these limitations by enhancing the physicochemical stability of bioactive compounds. Nanoencapsulation improves the bioavailability and efficacy of lipophilic substances while protecting them from degradation, thus providing novel solutions for leishmaniasis treatment [23–25].

Zein, a natural polymer derived from corn, has garnered attention due to its biocompatibility, biodegradability, and low toxicity. Its properties make it suitable for the development of micro/nanoparticles capable of encapsulating both hydrophilic and hydrophobic compounds [26,27].

This study presents an innovative approach that combines zein nanoparticles with the dichloromethane fraction (DCMF) of *Fridericia platyphylla*. This combination leverages zein nanoparticles' structural and chemical properties to encapsulate nonpolar compounds such as brachydins, addressing the challenges of poor bioavailability and stability associated with plant-derived extracts. To our knowledge, no previous studies have explored this specific integration for leishmaniasis treatment. Encapsulation protects the active compounds from degradation and facilitates targeted delivery to infected cells, enhancing antiparasitic efficacy and reducing systemic toxicity.

Given these considerations, this study aimed to develop and characterize a zein-based nanostructured polymeric system incorporating the apolar DCMF of *Fridericia platyphylla*. The system was evaluated for its leishmanicidal activity against promastigote and amastigote forms of *L. amazonensis* and its cytotoxicity in RAW 264.7 macrophages in vitro.

2. Materials and Methods

2.1. Chemicals

Zein and Pluronic F-68 were obtained from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA), pentamidine (PTD) was purchased from Sigma-Aldrich (Munich, Germany) with a minimum purity of 98%. The cell culture reagents were obtained from Gibco/Invitrogen (Carlsbad,

CA, USA). All other chemicals were obtained from Sigma-Aldrich (Munich, Germany), Merck (Munich, Germany) and Isofar (São Paulo, Brazil).

2.2. Plant Material

The roots of *F. platyphylla* were harvested in April 2021 at Sant'Ana da Serra farm, located in João Pinheiro, Minas Gerais, Brazil. Professor Maria Cristina Teixeira Braga Messias identified the plant species at the José Badine Herbarium, ICEB, Federal University of Ouro Preto. A voucher specimen (no. 17935) was deposited in the Herbarium of the Federal University of Ouro Preto, Brazil. The collection complied with Brazilian biodiversity protection regulations (SisGen No. A451DE4).

2.3. Extract Collection, Fractionation and Characterization

The extract and dichloromethane fraction (DCMF) were prepared following the procedure outlined by [17]. In summary, the roots of *F. platyphylla* were first dried and then ground using a knife mill. The resulting root powder underwent percolation with an ethanol/water mixture (7:3). After filtration, the ethanolic extract was collected and evaporated to dryness under reduced pressure at 40 °C to yield the crude extract. This extract was diluted in H₂O: MeOH (7:3) and subjected to liquid–liquid partitioning to separate the dichloromethane (DCM) and water/methanol fractions. The dry DCM fraction was obtained by lyophilization after the removal of solvents from the DCM layer, resulting in a solid residue, then analyzed using high-performance liquid chromatography with photodiode array detection (HPLC-PDA) and liquid chromatography–mass spectrometry (LC-MS). The detailed chemical characterization methods for the fraction are provided in the work by [17].

2.4. Preparation of Zein Nanoparticles Loaded with DCMF

Zein nanoparticles (ZNP) were synthesized using the antisolvent precipitation method described by [28], with slight modifications. A hydroethanolic solution (85% *v/v*) containing 2% *w/v* of zein was prepared and stirred overnight. The solution was then purified by centrifugation for 30 min, followed by heating in a water bath for 15 min, and filtered through a 0.45 µm Millipore membrane to remove any insoluble particles. After filtration, 10 mg of DCMF was incorporated into 10 mL of the zein solution. In parallel, an aqueous solution of Pluronic F-68 (2% *w/v*) was prepared, and the pH was adjusted to 4. Using a 10 mL syringe, the zein–DCMF solution was rapidly injected into 30 mL of the Pluronic F-68 solution under magnetic stirring. The ethanol in the final colloidal dispersions was then removed using rotary evaporation at 40 °C (20 mL). The nanoparticle synthesis process was optimized to ensure improved particle size, polydispersity index, and encapsulation efficiency. The dichloromethane fraction (DCMF) concentration was optimized based on its solubility in the zein solution. Different DCMF concentrations (10 mg/mL, 5.0 mg/mL, 1.5 mg/mL, 1.0 mg/mL, and 0.5 mg/mL) were tested, with 0.5 mg/mL selected due to its superior stability. The resulting ZNP-DCMF nanoparticles were stored at 0.5 mg/mL concentration in an amber bottle at room temperature (25 °C).

2.5. Characterization of the Nanoparticle

The hydrodynamic diameter, polydispersity index, zeta potential and encapsulation efficiency of nanoformulation were monitored on days 0, 7, 14, 21, 28, 35, 42 and 49 of storage.

2.5.1. Hydrodynamic Diameter, Polydispersity Index, and Zeta Potential

Photon correlation spectroscopy and microelectrophoresis were utilized to measure the nanoparticle systems' hydrodynamic diameter, polydispersity index, and zeta potential. The samples were diluted in Milli-Q water and analyzed using a ZetaSizer ZS 90 (Malvern®) at a fixed angle of 90° and a temperature of 25 °C. The measurements were conducted in a volumetric cell of the NanoSight LM10 system, equipped with a 532 nm (green) wavelength

laser, a CMOS camera, and NanoSight software (version 3.1). Each measurement was performed in triplicate.

2.5.2. Encapsulation Efficiency Profile by HPLC-PDA

The amount of DCMF encapsulated in the nanoparticles was determined by the ultrafiltration/centrifugation method, in which the nanoparticle suspension was filtered using regenerated cellulose filters with a 10 kDa exclusion pore size (Microcon, Millipore), allowing only the passage of unencapsulated DCMF. HPLC quantified the DCMF in the ultrafiltrate. The amount of unencapsulated DCMF was obtained by subtracting the amount of DCMF detected in the ultrafiltrate (i.e., the fraction that was not encapsulated and, therefore, passed through the filter) from the total amount of DCMF initially added to the system (considered as 100%). In this way, it was possible to calculate the encapsulation efficiency of the nanoparticles, with encapsulated DCMF being considered as the fraction retained by the nanoparticles. Several studies have used this technique to determine the EE of active ingredients in nanocarriers [29,30]. Quantifying the three bradydins present in the DCMF, the profiles of ZN-DCMF and ZNP-WHITE were obtained using an Ultimate 3000 instrument (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). Chromeleon 7.2 software was used for the acquisition and interpretation of chromatograms. The mobile phase was H₂O: MeOH acidified with 0.01% formic acid in gradient mode (ranging from 70% to 100% MeOH), with a Phenomenex Luna C18 column (150 × 4.60 mm, 5 µm). The injection volume was 100 µL and the detector wavelength was 240 nm. All tests were conducted in triplicate. Linear regression applied to the calibration curve points of the bradydins in the DCMF yielded the following equations: $y = 31.593x - 1.8254$ ($r^2 = 0.9966$ – BRA1); $y = 88.744x - 12.261$ ($r^2 = 0.9944$ – BRA2); and $y = 211.63x + 28.32$ ($r^2 = 0.9903$ – BRA3).

2.5.3. Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FTIR)

The nanoparticle formulations, both with and without DCMF, and the physical mixture of the nanoparticle components were analyzed using an attenuated total reflectance (ATR) accessory on a Varian® FI-IR 660 spectrophotometer. The analysis was conducted across a wavenumber range of 400 to 4000 cm^{−1}, with each sample undergoing 32 scans at a resolution of 8 cm^{−1}.

2.5.4. Differential Scanning Calorimetry (DSC)

Samples (~5 mg) of the nanoparticle formulations, both with and without DCMF, were placed in aluminum holders and analyzed using differential scanning calorimetry (DSC) with a Q20 model from TA Instruments. The analysis was conducted over a 25–300 °C temperature range, with a heating rate of 10 °C/min, under a nitrogen flow of 50 mL/min.

2.5.5. Atomic Force Microscopy (AFM)

Atomic force microscopy was employed to verify the incorporation of nanoparticles into the polymeric gel matrix and examine the nanoparticles' morphology. Samples containing nanoparticles embedded in the gel were prepared by spreading the undiluted formulation onto a silicon surface and allowing it to dry in a desiccator. The analysis was conducted using a BTO2217 microscope from Nanosurf, equipped with a ContAL-G-10 cantilever and a TapA1-G tip (BudgetSensors, Izgrev, Bulgaria), operating in intermittent contact mode at 90 Hz. The resulting images (256 × 256 pixels, TIFF format) were analyzed using the free Gwyddion software (<http://gwyddion.net/>) (accessed on 5 May 2024).

2.6. Biological Assay

2.6.1. Maintenance of *L. amazonensis* Promastigotes

L. amazonensis (MHOM/BR/1987/BA-125) promastigotes were cultured in Schneider medium enriched with 10% fetal bovine serum (FBS), 50 µg/mL gentamicin, 0.4 g/L sodium bicarbonate, and 0.6 g/L calcium chloride, adjusted to a pH of 6.8. The culture was incubated at 27 °C in a Biochemical Oxygen Demand (BOD) incubator. For the experiments,

promastigotes in the stationary growth phase (4 days of culture) exhibiting flagellar motility were used [31].

2.6.2. Differentiation of Promastigote Forms of *L. amazonensis* in Axenic Amastigotes

To obtain axenic amastigotes, promastigotes (5.0×10^7 /mL) in the stationary phase were cultured in Schneider medium with a pH of 5.5, supplemented with 5% FBS, 50 µg/mL gentamicin, 0.4 g/L sodium bicarbonate, and 0.6 g/L calcium chloride. The culture was maintained at 32 °C in a BOD incubator for 96 h. Amastigote morphology was analyzed using Giemsa staining and microscopy (see Supplementary Material, Figure S1).

2.6.3. In Vitro Leishmanicidal Activity

Promastigotes (5×10^7 cells/mL) were treated with varying concentrations of DCMF (500 to 0.06 µg/mL) and ZNP-DCMF (125 to 0.06 µg/mL) in triplicate and incubated for 48 h at 26 °C in 100 µL of supplemented Schneider medium. The negative control included promastigotes cultured with only Schneider medium and 1% DMSO. At the same time, Pentamidine (50 to 1.56 µg/mL) served as the positive control, and ZNP without DCMF was used as the blank. For axenic amastigotes, parasites (1×10^6 /well) were treated with serial concentrations of DCMF (500 to 0.06 µg/mL) and ZNP-DCMF (125 to 0.06 µg/mL) in triplicate and incubated for 24 h at 32 °C in supplemented Schneider medium. The negative control was amastigotes in Schneider medium and 1% DMSO, Pentamidine (50 to 1.56 µg/mL) was the positive control, and ZNP without DCMF was the blank. Cytotoxicity was assessed by MTT assay.

2.6.4. In Vitro RAW 264.7 Macrophage Cytotoxicity Assay

To assess cytotoxicity in normal cells, RAW 264.7 murine macrophages were cultured in a 96-well plate with the same concentrations of DCMF and ZNP-DCMF used for *L. amazonensis* promastigotes, in 100 µL of RPMI-1640 medium supplemented with 100 µg/mL penicillin, 100 U/mL streptomycin, 0.25 µg/mL amphotericin B, and 10% FBS. The assay was performed in triplicate with cells incubated at 37 °C and 5% CO₂. The negative control comprised macrophages in a supplemented RPMI medium with 1% DMSO, while 100% DMSO was the positive control, and ZNP without DCMF served as the blank. Cell viability was measured using the MTT assay after 48 h.

2.6.5. MTT Assay

The MTT assay determined cell viability for *L. amazonensis* promastigotes, axenic amastigotes, and RAW macrophages. Following incubation, the plates were centrifuged, and the supernatant was replaced with fresh medium containing MTT (5 mg/mL). The plates were incubated in a BOD incubator for 3 h, then centrifuged again, and the formazan crystals were dissolved in 100 µL of pure DMSO. Absorbance was measured at 540 nm using a microplate reader [32]. The selectivity index (S.I.) was calculated by dividing CC₅₀ by IC₅₀, where an S.I. greater than 1 indicates higher toxicity to the parasite, and an S.I. less than 1 indicates higher toxicity to the cell. A higher S.I. value reflects greater selectivity towards the parasite and reduced toxicity to the cell.

2.6.6. Statistical Analysis

The software used for statistical analysis was GraphPad Prism 8.0 (GraphPad Inc., San Diego, CA, USA). Data were subjected to an analysis of variance (ANOVA) and differences between means were determined by Tukey's test ($p \leq 0.05$) to obtain the mean, IC₅₀ and CC₅₀.

3. Results and Discussion

3.1. Characterization and Stability of the Nanoparticle Containing DCMF

In this study, a zein nanoparticle was developed to create a carrier system for DCMF from *F. platyphylla*, containing the three dimeric flavonoids known to contain brachydins

(Figure 1), thus offering a new alternative therapy to combat Leishmaniasis. The thorough chemical analysis of DCMF and the measurement of the brachydins within the fraction have been detailed in earlier research carried out by our team [17,33]. To verify the presence of brachydins in the DCMF, we conducted an HPLC-PDA analysis. We compared the results with the genuine brachydins standards isolated by our group (see Supplementary Material, Figure S2).

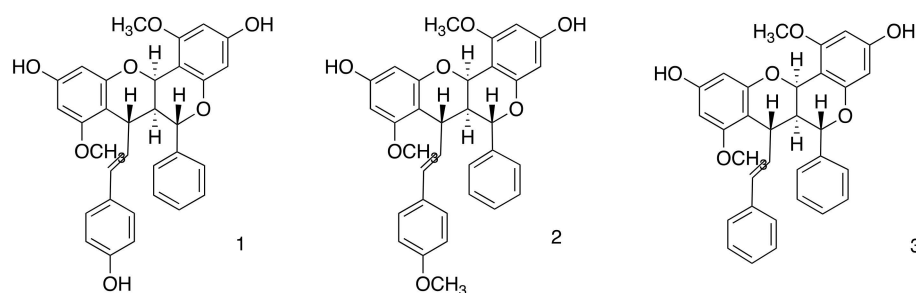


Figure 1. Chemical structure of brachydins present in the dichloromethane fraction (DCMF), (1) Brachydin 1 (BRA1), (2) Brachydin 2 (BRA2), and (3) Brachydin 3 (BRA3).

The antisolvent precipitation method was used to develop the system, introducing a hydroethanolic zein solution into an aqueous solution. Zein is an amphiphilic protein with hydrophobic and hydrophilic properties, facilitating its interaction with hydrophobic or partially hydrophobic compounds, such as bradykinins in the DCM fraction. It is soluble in binary solvents containing alcohol, and due to its high isoelectric point, there is a tendency for protein chains to aggregate in formulations with neutral or basic pH [28]. For this reason, using a surfactant is necessary to act as a stabilizing agent during manufacturing zein nanoparticles containing active ingredients like DCMF. Pluronic F-68 is an amphiphilic block copolymer composed of polyethylene glycol (PEG) and polypropylene glycol (PPG) chains, giving it hydrophilic and hydrophobic properties. Its main functions are to stabilize the nanoparticles and increase the solubility of bioactive compounds [34].

Table 1 shows the initial physical–chemical characterization of the zein nanoparticles with measurements of mean diameter (MD) measured by dynamic light scattering (DLS), polydispersity index (PDI), zeta potential (ZP), hydrogen potential (pH) and encapsulation efficiency (EE).

Table 1. Physicochemical characterization of the control nanoparticle (ZNP) and nanoparticle loaded with DCMF (ZNP-DCMF).

Samples	DLS (nm)	PDI	ZP (mV)	pH	EE%
ZNP	142 ± 1	0.185 ± 0.02	31.2 ± 1.1	4.01 ± 0.01	-
ZNP-DCMF	206 ± 4	0.207 ± 0.05	5.0 ± 0.3	4.07 ± 0.02	99.8 ± 0.1

The parameters analyzed were the mean diameter (MD) measured by dynamic light scattering (DLS), polydispersity index (PDI), zeta potential (ZP), potential hydrogenionic (pH) and encapsulation efficiency (EE). ZNP: Empty nanoparticles. ZNP-DCMF: Nanoparticles loaded with DCMF. -: Analysis not increased as mean ± standard deviation ($n = 3$).

The results indicated that the addition of the fraction (ZNP-DCMF) led to an increase in the average diameter of the nanoparticles compared to the control nanoparticles (ZNPs), which can be attributed to the fact that, in general, the incorporation of active compounds into polymeric nanoparticles tends to promote an increase in particle diameter [35]. The control and DCMF nanoparticle showed polydispersity rates of less than 0.2. It can also be seen that the formulation containing DCMF showed zeta potential values of approximately 5.0 mV and both formulations showed similar pH values. In addition, the DCMF showed high interaction with the zein matrix, with encapsulation efficiency values of 99.8%.

To assess the stability of the formulations, the control nanoparticle (ZPN) and the nanoparticle containing DCMF (ZPN-DCMF) were analyzed according to storage time (Figure 2).

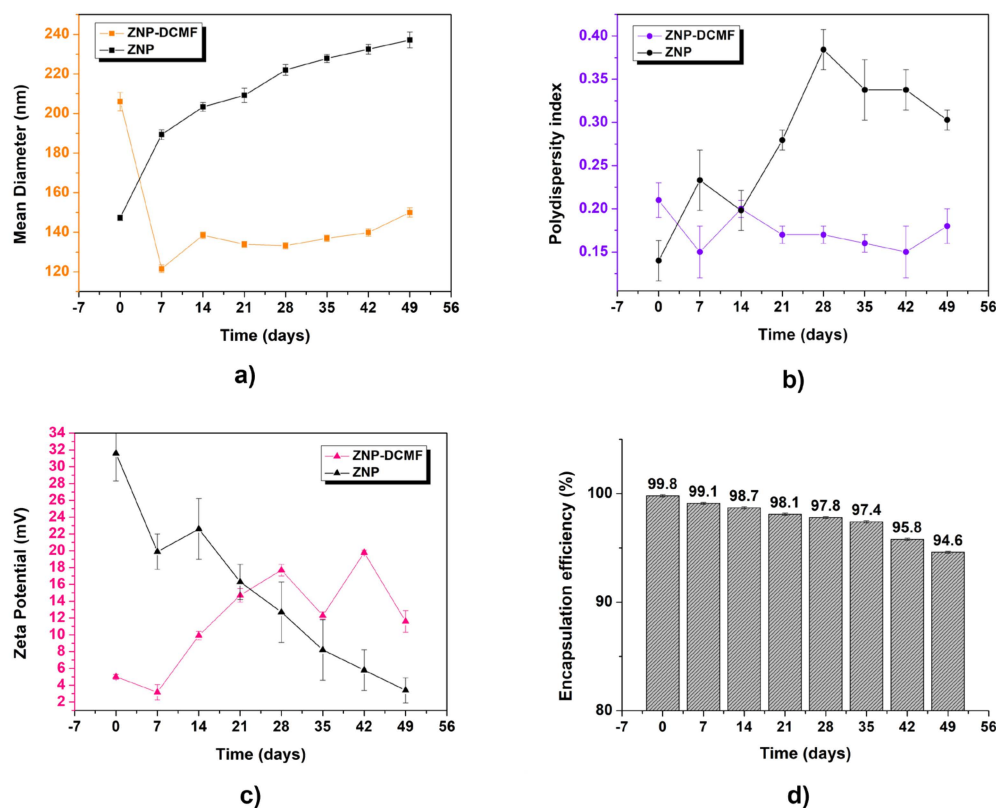


Figure 2. Characterization of control zein nanoparticles (ZNPs) and zein nanoparticles containing DCMF (ZNP-DCMF). (a) Mean diameter (nm) by DLS, (b) polydispersity index, (c) zeta potential (mV), and (d) encapsulation efficiency (%). The analyses were carried out for 49 days and all in triplicate at 25 °C.

The ZPN and ZPN-DCMF average diameter results in Figure 2a show an increase as a function of storage time. However, it should be noted that the most significant increase in average particle diameter was observed for the control of nanoparticles compared to the nanoparticles containing DCMF. This could be attributed to the stabilizing effect of the presence of the active ingredient, which prevented the formation of aggregates. Similar results were observed by [36], who prepared zein nanoparticles to encapsulate eugenol and garlic essential oil. The formulation without the active ingredients showed a larger average diameter than the other nanoformulations, precipitating within 60 days of storage, while the latter could be analyzed over a more extended period. ZNP had an average diameter of 142 ± 1 nm at the start, and after 49 days, this value was 239 ± 3 nm. For ZNP-DCMF, the initial average diameter was 206 ± 4 nm, and after 49 days it was 150 ± 2 nm. No aggregate formation or precipitation of the system was observed throughout the storage period, and no significant changes were observed as a function of time, indicating that the formulation remained stable with a unimodal profile, i.e., the existence of only one type of nanocarrier population.

The polydispersity index results in Figure 2b show a significant increase in particle size for the ZNP over the period analyzed. This was not observed for the ZNP-DCMF, indicating a homogeneous and monodisperse particle size distribution. It should also be noted that these results corroborate those presented by the average diameter, since the control nanoparticles (ZNPs) showed a more significant change in values compared to those containing DCMF.

Regarding the zeta potential results (Figure 2c), ZNP showed a significant decrease in values (from 31.2 ± 1.1 mV to a final value of 21.8 ± 0.5 mV). At the same time, ZNP-DCMF exhibited a less pronounced increase in zeta potential over time, reaching approximately 11.6 ± 1.3 mV after 49 days, which is considered a moderate stability value for nanoscale formulations [37,38]. Although a moderately stable particle population was observed, falling outside the ideal stability range (± 30 mV), the decrease in zeta potential in ZNP and ZNP-DCMF occurs for different reasons. In ZNP, the main reason is the absence of active ingredients, a trend also observed in the analysis of average diameter and PDI. In ZNP-DCMF, which contains the active ingredient rich in brachydins, the reduction is primarily due to a combination of hydrophobic interactions from nonpolar compounds present in this fraction, which reduce the surface charge density, and the effect of Pluronic, which masks these charges and stabilizes the particles through a steric barrier. This results in lower electrostatic repulsion between particles without necessarily compromising colloidal stability, which is maintained by the steric stabilization provided by Pluronic [39]. Therefore, the reduction in zeta potential does not necessarily indicate instability of the nanoparticle containing the DCMF.

The formulations' encapsulation efficiency (Figure 2d) over time was analyzed to evaluate the stability of DCMF within the nanoparticles. Numerous factors influence the encapsulation rate of active ingredients in nanostructured systems, including the physicochemical properties of the active ingredient (e.g., solubility), the type of surfactant, polymer characteristics, pH of the medium, and the concentration of the active ingredient used [40,41]. Zein nanoparticles containing DCMF initially demonstrated an encapsulation efficiency of $99.8 \pm 0.1\%$. Over 49 days of storage, a slight decrease of 5.2% was observed, with efficiency reaching $94.6 \pm 0.1\%$. These results confirm the method's effectiveness in maintaining stable nanoencapsulation of DCMF extracted from *Fridericia platyphylla* over time.

The high encapsulation efficiency of brachydins in zein nanoparticles is due to favorable physicochemical interactions. The hydrophobic regions of brachydins interact strongly with the hydrophobic core of zein, aiding their incorporation into the nanoparticle matrix. These interactions are further stabilized by hydrogen bonds with zein's polar groups, van der Waals forces, and electrostatic interactions on the zein surface. Pluronic F-68, a non-ionic surfactant, enhances nanoparticle stability by forming a protective steric barrier, preventing aggregation and increasing homogeneity. Although Pluronic partially emulsifies some brachydins that are not fully encapsulated, this emulsification does not compromise the encapsulation efficiency. Encapsulated brachydins release slowly, while those interacting with Pluronic exhibit controlled release. This combination of interactions ensures high encapsulation efficiency (94.6%) and protects brachydins from degradation, enhancing the formulation's stability and efficacy.

The results align with published studies using similar nanoparticle preparation methods. For instance, ref. [42] characterized zein nanoparticles stabilized with Pluronic to encapsulate geraniol and citronellal, achieving particle diameters of 80–200 nm, polydispersity indices > 0.3 , zeta potentials between 10 and 33 mV, and encapsulation efficiencies $> 90\%$ over 120 days. Similarly, ref. [43] described zein nanoparticles containing eugenol and garlic essential oil, which exhibited high encapsulation efficiencies ($> 90\%$), spherical morphologies, average diameters of ~ 150 nm, polydispersity indices of 0.2, and zeta potentials of ~ 30 mV. These formulations protected active compounds from degradation, maintaining stability for over 90 days.

3.2. Characterization by Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FTIR)

Infrared spectroscopy (FTIR) was used to investigate the interactions of DCMF with the zein nanoparticles and to determine whether the preparation process altered the components of the formulation. DCMF, the nanoparticle constituents (Zein and Pluronic F-68) and the nanoparticle loaded with DCMF were analyzed (Figure 3).

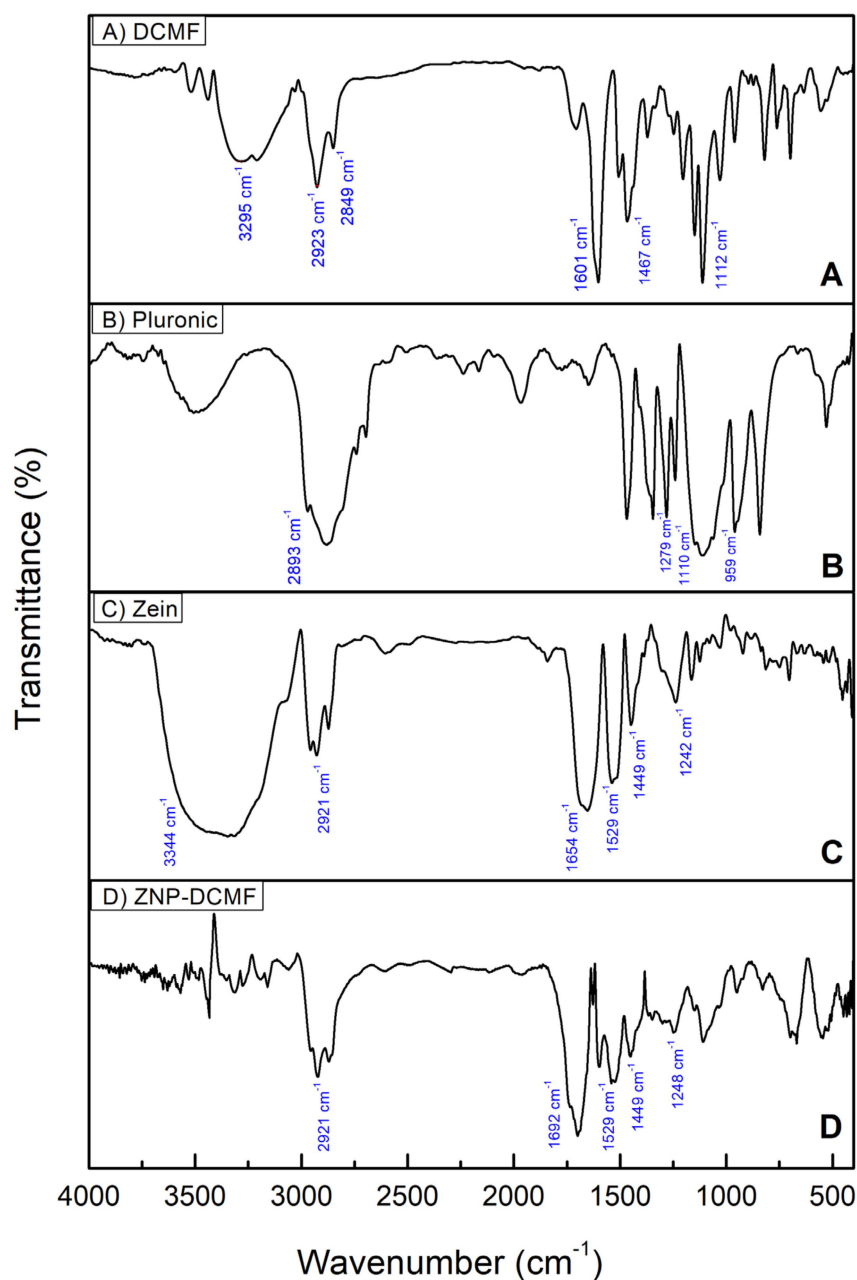


Figure 3. Characterization by FTIR using the ATR mode. (A) DCMF, (B) Pluronic F-68, (C) zein, and (D) ZNP-DCMF.

In Figure 3A, which refers to DCMF, specific bands alluding to the O-H groups of phenol in the 3295 cm^{-1} region stand out. Also noticeable in the 2849 and 2923 cm^{-1} regions are the C-H stretching vibrations of alkanes, while at 1601 and 1467 cm^{-1} , the specific aromatic C=C vibrations stand out, as well as the CO bonds observed at 1112 cm^{-1} . These data corroborate the NMR findings of [17] for the three brachydins in DCMF.

For the Pluronic (Figure 3B), the main bands were found at 2893 cm^{-1} corresponding to vibrations of the C-H bonds, at $959/1110\text{ cm}^{-1}$ stretching vibrations corresponding to the C-O bond (symmetrical and asymmetrical, respectively) of the ether group, and at 1279 cm^{-1} vibration corresponding to the CH_2 group [44,45].

As expected, the spectrum of pure zein (Figure 3C) showed the characteristic bands corresponding to amides I, II, and III at 1654 (C=O stretch), 1529 (NH deformation and CN stretch), and 1242 cm^{-1} , respectively. The peak at 3344 cm^{-1} corresponds to NH stretching. Also noticeable in the zein spectrum is the presence of a band referring to C-H bonds,

which is in the spectral region at around 2921 cm^{-1} , due to the presence of amino acids and fatty acids, as well as the presence of CH_2 stretches, which are predominant in proteins and lipids, in the region between 1300 and 1500 cm^{-1} [46,47].

The FTIR results for ZNP-DCMF (Figure 3D) show that the bands characteristic of zein are present in the nanoparticle. In contrast, the bands characteristic of DCMF do not appear in the nanoparticle loaded with this active. This suggests that DCMF is encapsulated. In addition, the results indicate an interaction between the zein and the hydrophobic groups of the fraction, corroborating the findings of [32], who also used this technique to characterize zein nanoparticles loaded with geraniol and citronellal. In general, the FTIR results showed that no new bands appeared after the interaction between DCMF and the zein nanoparticle, indicating that the interactions were physical rather than chemical.

3.3. Characterization by Differential Scanning Calorimetry (DSC)

DSC analyses were carried out to better characterize and observe the interaction between DCMF and the zein nanoparticle. The results are shown in Figure 4, which shows the heat flow (W/g) as a function of temperature ($^{\circ}\text{C}$).

The DSC curve for DCMF (Figure 4A) showed four endothermic thermal events. The first at 91.27°C , is probably related to the loss of water and volatile constituents present in the sample [48]. The second, third and fourth thermal events occurred at 273.79°C , 305.93°C and 349.68°C , probably related to the fusion of the three brachydins in DCMF. In the literature consulted, no references were found to DSC characterization studies of the plant species *F. platyphylla* and/or its fractions, making it impossible to compare their thermal behavior.

The thermogram of the Pluronic (Figure 4B) shows a well-defined, narrow and wide-ranging endothermic peak at 55.23°C . Similar values were found by [49]. The thermogram of zein (Figure 4C) showed two broad, endothermic peaks, one at 91.27°C , slightly higher than that found in the literature (73°C , possibly due to protein hydration [27], and the second peak at 297.06°C .

The DSC analysis of ZNP-DCMF (Figure 4D) showed peaks around 106.14°C and 319.47°C , which shows a shift in the endothermic peaks, evidencing a possible interaction between DCMF and the components of the nanoparticle [50], suggesting that the increase in the degradation temperature of zein/lectin particles loaded with curcumin is due to an increase in the hydrophobic effect and electrostatic interaction between the components of the particles. Similar results were found when the concentration of shellac was increased in the formation of zein nanoparticles. It was suggested that the nanoparticle size may better influence thermal stability [51]. The displacement of the endothermic peaks and the absence of peaks referring to DCMF also show no significant amounts of the fraction outside the nanoparticle, corroborating the results found in the encapsulation efficiency tests.

3.4. Atomic Force Microscopy (AFM)

Atomic force microscopy was used to check the morphological aspects of the zein nanoparticle containing DCMF. Figure 5 shows AFM micrographs of ZNP-DCMF. Analysis of the AFM micrographs of the zein nanoparticles with DCMF showed that the particles had a rounded appearance with a uniform size distribution, and no aggregates were observed. The average particle size was $163 \pm 25\text{ nm}$, like the DLS result in Figure 2. The average sizes found in this work are consistent with values reported for polymeric nanoparticles [41]. Ref. [43] reported similar sizes for zein nanoparticles loaded with eugenol and garlic essential oil, which ranged from 148 to 180 nm according to the amount of encapsulated oil and exhibited spherical shapes.

The results presented in Figures 2 and 5 show a noticeable difference between the nanoparticle sizes obtained via DLS and AFM. DLS revealed an average hydrodynamic size of approximately 178 nm (mean over 49 days), with an average polydispersity index (PDI) of 0.15 , indicating a relatively homogeneous size distribution in solution. Conversely, AFM

images displayed more significant heterogeneity in the solid state, which can be attributed to the aggregation tendency of nanoparticles in this environment.

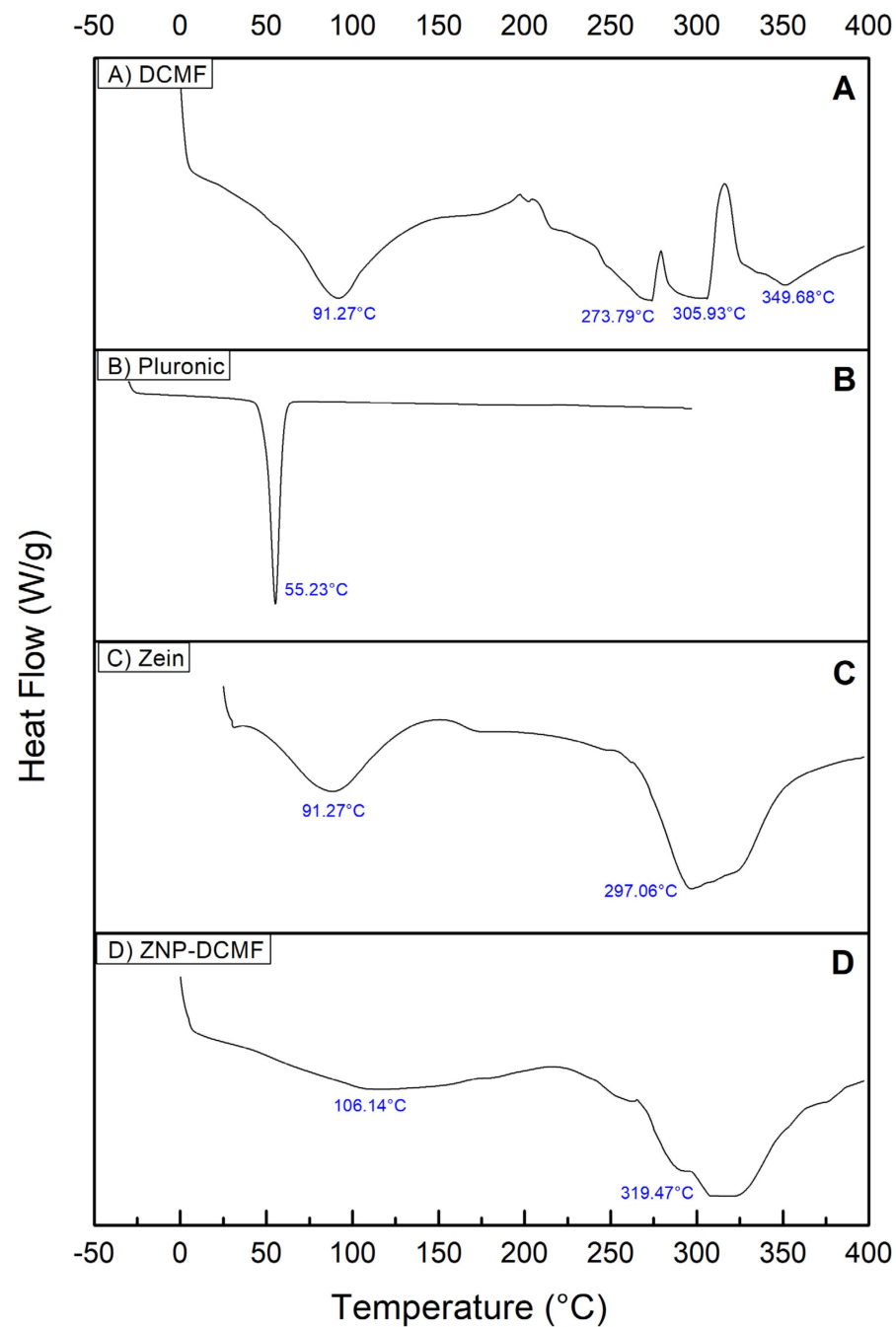


Figure 4. Characterization by differential scanning calorimetry (DSC). (A) DCMF, (B) Pluronic F-68, (C) zein and (D) ZNP-DCMF.

This aggregation can be explained by the intrinsic hydrophobicity of zein and the hydrophobic interactions of Pluronic F-68, which are key components of the formulation. Pluronic F-68 contributes to system stability through steric barriers that prevent aggregation, even with a relatively low mean zeta potential of 8.3 mV over the evaluated period. However, in the solid state, hydrophobic forces between nanoparticles become predominant, leading to aggregate formation and explaining the more significant morphological heterogeneity observed [52]

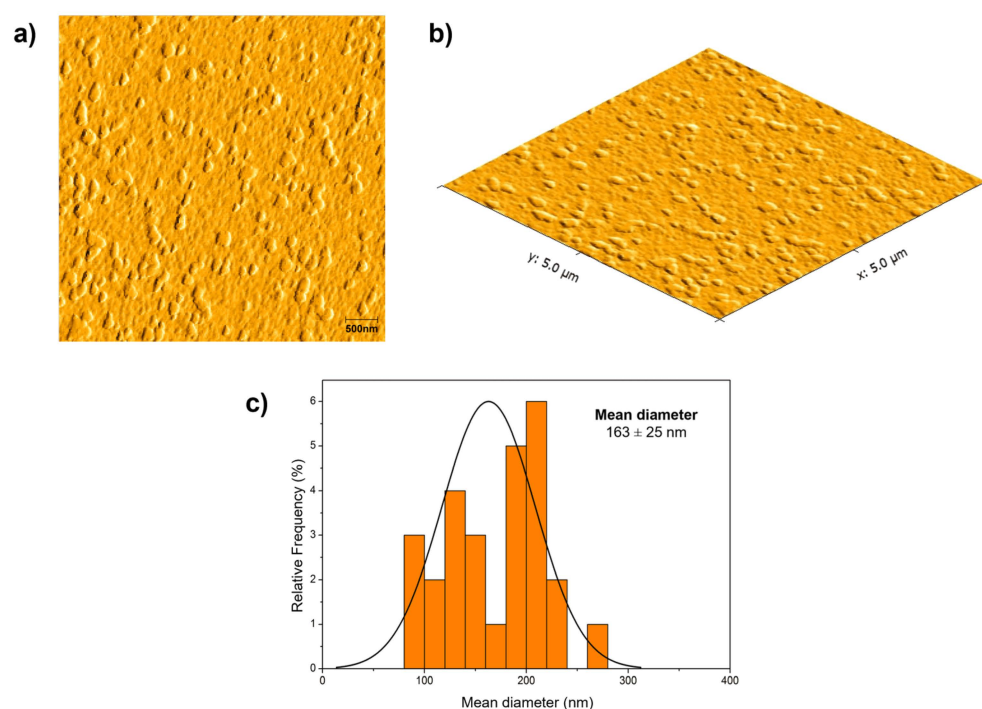


Figure 5. Micrographs obtained for nanoparticle using an atomic force microscope: (a) zein nanoparticles loading DCMF (2D image); (b) zein nanoparticles loading DCMF (3D image); (c) size distribution for zein nanoparticles loading DCMF. The analyses were performed using Gwyddion software.

Thus, the differences between DLS and AFM reflect the distinct measurement environments: DLS evaluates nanoparticles dispersed in a liquid medium, while AFM captures the morphology of particles after drying. The observation of aggregates in the solid state does not contradict the DLS data but rather underscores the importance of considering interparticle interactions and environmental conditions when designing controlled release systems.

3.5. Nanoparticles Containing DCMF from *F. platyphylla* Show Antileishmanial Activity In Vitro

Table 2 presents the results of the activity of the pentamidine (PNT), the fraction (DCMF), and zein nanoparticles loaded with the fraction (ZNP-DCMF) against *L. amazonensis*. Antiparasitic activity against promastigote forms was concentration-dependent for DCMF ($IC_{50} = 253.1 \mu\text{g/mL}$) and ZNP-DCMF ($IC_{50} = 36.33 \mu\text{g/mL}$) (see Supplementary Material, Figure S3). Interestingly, the IC_{50} of ZNP-DCMF was significantly lower than that of DCMF against *L. amazonensis*. Similar results were found when DCMF and ZNP-DCMF were tested against axenic amastigote forms (IC_{50} of $6.96 \mu\text{g/mL}$ and $0.72 \mu\text{g/mL}$, respectively), indicating reduced parasite viability (see Supplementary Material, Figure S4). DCMF demonstrated a reduction comparable to that of the standard drug (PNT); however, ZNP-DCMF exhibited the lowest IC_{50} value for amastigote forms.

Additionally, in this study, a cytotoxicity assay on RAW 264.7 macrophages showed that ZNP-DCMF exhibited no toxicity ($CC_{50} > 500 \mu\text{g/mL}$), demonstrating high selectivity for the parasite in both forms (Figure 6). Pentamidine was the most toxic compound ($CC_{50} = 178.0 \mu\text{g/mL}$). The selectivity index (S.I. = CC_{50}/IC_{50}) is a value that relates activity to cytotoxicity. The higher the selectivity index (>1), the more selective the drug is for the parasite [53]. Surprisingly, the selectivity index value increased when DCMF was encapsulated in zein nanoparticles, rising from 1.18 to 13.76 for promastigote forms and 43.11 to 694.4 for axenic amastigotes, respectively. Its action against the obligatory intracellular form (amastigote) in the vertebrate host underscores its clinical significance and potential benefits, as it can reduce parasitic load within cells, inhibiting infection progression.

Table 2. Inhibitory concentration detected in promastigote and axenic amastigote forms of *L. amazonensis* and cytotoxic concentration in RAW 264.7 macrophages treated with PNT, DCMF and ZNP-DCMF.

Promastigote			
Samples	IC ₅₀ (µg/mL)	CC ₅₀ (µg/mL)	S.I.
PNT	4.0	178.0	44.50
DCMF	253.1	300.1	1.18
ZNP-DCMF	36.33	>500	13.76
Amastigote			
PNT	5.0	178.0	35.60
DCMF	6.96	300.1	43.11
ZNP-DCMF	0.72	>500	694.44

PNT: pentamidine; DCMF: dichloromethane fraction; ZNP-DCMF: zein nanoparticles loading DCMF; CC₅₀: cytotoxic concentration to 50% of macrophages; IC₅₀: cytotoxic concentration to 50% of parasites; S.I.: selectivity index (CC₅₀/IC₅₀).

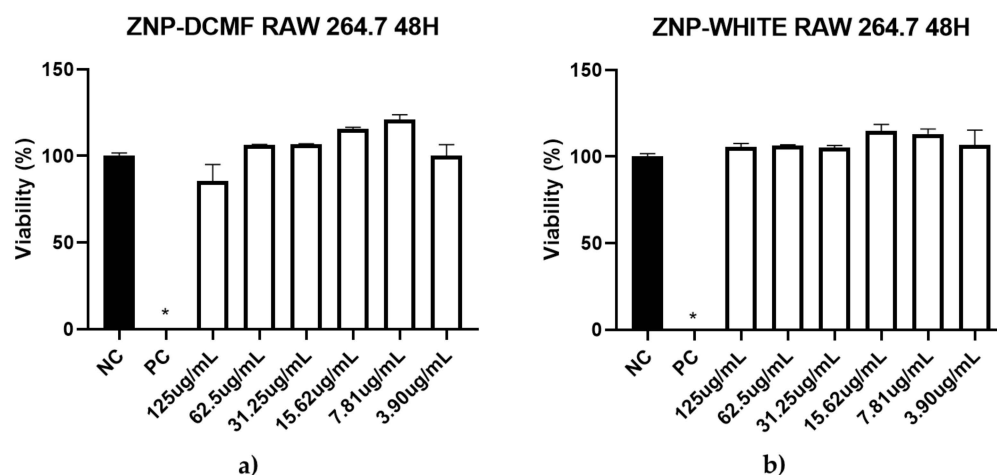


Figure 6. Cytotoxic activity of ZNP-DCMF (a) and ZNP-WHITE (b) against RAW 264.7 macrophages strain treated for 48 h. NC = negative control; PC = positive control; * asterisks indicate statistically significant differences to the negative control at $p < 0.05$.

Over the past decade, drug delivery systems based on natural or synthetic polymers have been widely used to enhance the efficacy of leishmaniasis treatment [8]. Similarly, combining nanoparticles with natural products with leishmanicidal potential has been researched to develop new therapies. These nanocarriers offer the advantage of penetrating cells such as macrophages and reaching the infectious parasite, enabling targeted and efficient drug release [54,55]. Moreover, natural compounds have shown the ability to induce changes in cellular structures, including at the mitochondrial level, resulting in the death of promastigote and intracellular amastigote forms [56,57]. However, it is noteworthy that there have yet to be any previous studies on developing zein nanoparticles for releasing active ingredients present in DCMF from the plant species *Fridericia platyphylla*. Thus, this study presents promising new perspectives for the application of nanoparticles in combating leishmaniasis.

4. Conclusions

In conclusion, developing a zein nanoparticle system encapsulating the active nonpolar fraction (DCMF) of *Fridericia platyphylla* demonstrated significant antileishmanial activity with reduced cytotoxicity and enhanced selectivity. This innovative approach improves the therapeutic efficacy and protects the bioactive compounds from degradation, offering a promising and sustainable alternative for treating leishmaniasis with fewer side effects.

Integrating natural compounds with nanotechnology presents a valuable strategy for advancing leishmaniasis treatment, although further studies are needed to assess its clinical safety and efficacy.

Supplementary Materials: The following supporting information can be downloaded at <https://www.mdpi.com/article/10.3390/pharmaceutics16121603/s1>, Figure S1. They are obtaining axenic amastigote forms. The culture of axenic amastigotes was obtained from an early stationary phase culture of *Leishmania amazonensis* promastigotes observed under light microscopy. (a) Promastigotes form in the stationary phase; (b) forms amastigote on day 4 of culture without externalized flagellum. Reference bar: 25 μ m. Figure S2. a) Chromatographic profile of DCMF (A), ZNP-DCMF (B) and ZNP-WHITE, obtained by HPLC-PDA, and chemical structure of the compounds Brachyidin A (1), Brachyidin B (2) and Brachyidin C. Figure S3. Characterization by FTIR using the ATR mode. (A) DCMF, (B) Pluronic F-68, (C) Zein and (D) ZNP-DCMF. Figure S4. Characterization by differential scanning calorimetry (DSC). (A) DCMF, (B) Pluronic F-68, (C) Zein and (D) ZNP-DCMF. Figure S5. Viability of *L. (L) amazonensis* promastigotes forms treated for 48 h with DCMF (a) ZNP-DCMF (b) and ZNP-WHITE (c). NC = negative control; PC = positive control; * asterisks indicate statistically significant differences about the negative control at $p < 0.05$. Figure S6. Viability of axenic *L. (L) amazonensis* amastigote forms treated for 48 h with DCMF (a) ZNP-DCMF (b) and ZNP-WHITE (c). NC = negative control; PC = positive control; * asterisks indicate statistically significant differences in relation to the negative control at $p < 0.05$.

Author Contributions: Conceptualization, M.A.d.N., J.L.d.O., L.F.F. and C.Q.d.R.; methodology, M.A.d.N., J.L.d.O., S.d.S.S.B. and C.M.d.J.; validation, M.A.d.N., J.L.d.O. and C.M.d.J.; formal analysis, M.A.d.N., L.F.F. and C.Q.d.R.; investigation, M.A.d.N., C.M.d.J., L.F.F. and C.Q.d.R.; resources, M.A.d.N., J.L.d.O., L.F.F. and C.Q.d.R.; writing—original draft preparation, M.A.d.N. and J.L.d.O.; writing—review and editing, M.A.d.N., J.L.d.O., L.F.F. and C.Q.d.R.; visualization, M.A.d.N., J.L.d.O., L.F.F. and C.Q.d.R.; supervision, L.A.S., L.F.F. and C.Q.d.R.; project administration, C.Q.d.R.; funding acquisition, L.F.F. and C.Q.d.R. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research was financed in part by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior—Brasil (CAPES)—Finance Code 001, PROCAD-AM [88887.472618/2019-00 (C.Q.d.R.) and CAPES-MEC INCTNanoAgro #88887.953443/2024-00] and FAPEMA [INFRA-02263/21 (C.Q.d.R.)], São Paulo State Research Support Foundation (FAPESP, grants, CBioClima—#2021/10639-5 and #2017/21004-5, L.F.F.), Brazilian National Council for Scientific and Technological Development (CNPq-MCTI-INCT NanoAgro #405924/2022-4, #308439/2021-0—L.F.F.).

Institutional Review Board Statement: Not applicable.

Informed Consent Statement: Not applicable.

Data Availability Statement: Data are contained within the article and Supplementary Materials.

Acknowledgments: To the Environmental Nanotechnology Laboratory of the São Paulo State University (UNESP) Campus Sorocaba, for the partnership in carrying out the analyses.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflicts of interest.

References

1. PAHO Leishmanioses. Informe Epidemiológico das Américas. *Informe de Leishmanioses* N° 7. Available online: <https://iris.paho.org/bitstream/handle/10665.2/50505/2019-cde-leish-informe-epi-das-americas.pdf> (accessed on 3 May 2024).
2. WHO Leishmaniasis. Fact Sheets. Available online: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/leishmaniasis> (accessed on 3 May 2024).
3. Brazil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância das Doenças Transmissíveis. Manual de Vigilância da Leishmaniose Tegumentar (2nd ed.). 2017. Available online: https://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/manual_vigilancia_leishmaniose_tegumentar.pdf (accessed on 3 May 2024).
4. Wyrepkowski, C.D.C.; Paz, A.d.C.; Jensen, B.B.; Franco, A.M.R. Aspectos farmacológicos da terapia medicamentosa utilizada para a leishmaniose cutânea: Uma revisão de literatura. *Rev. Eletrôn. Acervo Saúde* **2020**, *12*, e3352. [CrossRef]
5. Ordóñez-Gutiérrez, L.; Espada-Fernández, R.; Dea-Ayuela, M.A.; Torrado, J.J.; Bolás-Fernandez, F.; Alunda, J.M. In vitro effect of new formulations of amphotericin B on amastigote and promastigote forms of *Leishmania infantum*. *Int. J. Antimicrob.* **2007**, *30*, 325–329. [CrossRef] [PubMed]

6. Roatt, B.M.; de Oliveira Cardoso, J.M.; De Brito, R.C.F.; Coura-Vital, W.; de Oliveira Aguiar-Soares, R.D.; Reis, A.B. Recent advances and new strategies on leishmaniasis treatment. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2020**, *104*, 8965–8977. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
7. Sasidharan, S.; Saudagar, P. Leishmaniasis: Where are we and where are we heading? *Parasitol. Res.* **2021**, *120*, 1541–1554. [\[CrossRef\]](#)
8. Dos Santos, D.B.; Lemos, J.A.; Miranda, S.E.M.; Di Filippo, L.D.; Duarte, J.L.; Ferreira, L.A.M.; Barros, A.L.B.; Oliveira, A.E.M.F.M. Current Applications of Plant-Based Drug Delivery Nano Systems for Leishmaniasis Treatment. *Pharmaceutics* **2022**, *14*, 2339. [\[CrossRef\]](#)
9. Kayser, O.; Kiderlen, A.F.; Croft, S.L. Natural products as antiparasitic drugs. *Parasitol. Res.* **2003**, *90*, 55–62. [\[CrossRef\]](#)
10. Cheuka, P.; Mayoka, G.; Mutai, P.; Chibale, K. The Role of Natural Products in Drug Discovery and Development against Neglected Tropical Diseases. *Molecules* **2016**, *22*, 58. [\[CrossRef\]](#)
11. Ghodsian, S.; Taghipour, N.; Deravi, N.; Behniafar, H.; Lasjerdi, Z. Recent researches in effective antileishmanial herbal compounds: Narrative review. *Parasitol. Res.* **2020**, *119*, 3929–3946. [\[CrossRef\]](#)
12. Cortes, S.; Bruno de Sousa, C.; Morais, T.; Lago, J.; Campino, L. Potential of the natural products against leishmaniasis in Old World—A review of in-vitro studies. *Pathog. Glob. Health* **2020**, *114*, 170–182. [\[CrossRef\]](#)
13. Do Nascimento, J.R.; de Jesus Alves Miranda, A.; Vieira, F.C.; Rodrigues, C.D.P.; Vasconcelos, L.N.; Filho, J.L.P.; Lopes, A.C.C.B.; Tangerina, M.M.P.; Vilegas, W.; da Rocha, C.Q. A Review of the Phytochemistry and Pharmacological Properties of the Genus *Arrabidaea*. *Pharmaceutics* **2022**, *15*, 658. [\[CrossRef\]](#)
14. Da Rocha, C.Q.; Vilela, F.C.; Santa-Cecília, F.V.; Cavalcante, G.P.; Vilegas, W.; Giusti-Paiva, A.; dos Santos, M.H. Oleanane-type triterpenoid: An anti-inflammatory compound of the roots *Arrabidaea brachypoda*. *Rev. Bras. Farmacogn.* **2015**, *25*, 228–232. [\[CrossRef\]](#)
15. De Sousa Andrade, L.M.; de Oliveira, A.B.M.; Leal, A.L.A.B.; de Alcântara Oliveira, F.A.; Portela, A.L.; de Sousa Lima Neto, J.; de Siqueira-Júnior, J.P.; Kaatz, G.W.; da Rocha, C.Q.; Barreto, H.M. Antimicrobial activity and inhibition of the NorA efflux pump of *Staphylococcus aureus* by extract and isolated compounds from *Arrabidaea brachypoda*. *Microb. Pathog.* **2020**, *140*, 103935. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
16. Da Rocha, C.Q.; Vilela, F.C.; Cavalcante, G.P.; Santa-Cecília, F.V.; Santos-e-Silva, L.; dos Santos, M.H.; Giusti-Paiva, A. Anti-inflammatory and antinociceptive effects of *Arrabidaea brachypoda* (DC.) Bureau roots. *J. Ethnopharmacol.* **2011**, *133*, 396–401. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
17. Da Rocha, C.Q.; Queiroz, E.F.; Meira, C.S.; Moreira, D.R.M.; Soares, M.B.P.; Marcourt, L.; Vilegas, W.; Wolfender, J.-L. Dimeric Flavonoids from *Arrabidaea brachypoda* and Assessment of Their Anti-*Trypanosoma cruzi* Activity. *J. Nat. Prod.* **2014**, *77*, 1345–1350. [\[CrossRef\]](#)
18. Rocha, V.; Quintino da Rocha, C.; Ferreira Queiroz, E.; Marcourt, L.; Vilegas, W.; Grimaldi, G.; Furrer, P.; Allémann, É.; Wolfender, J.-L.; Soares, M. Antileishmanial Activity of Dimeric Flavonoids Isolated from *Arrabidaea brachypoda*. *Molecules* **2018**, *24*, 1. [\[CrossRef\]](#)
19. Maciel-Silva, V.L.; da Rocha, C.Q.; Alencar, L.M.R.; Castelo-Branco, P.V.; Sousa IH de Azevedo-Santos, A.P.; Vale, A.A.M.; Monteiro, S.G.; Soares, R.-E.P.; Guimarães, S.J.A.; do Nascimento, J.R.; et al. Unusual dimeric flavonoids (brachydins) induce ultrastructural membrane alterations associated with antitumor activity in cancer cell lines. *Drug Chem. Toxicol.* **2023**, *46*, 665–676. [\[CrossRef\]](#)
20. De Lima, C.A.; Cubero, M.C.Z.; Franco, Y.E.M.; Rodrigues, C.D.P.; do Nascimento, J.R.; Vendramini-Costa, D.B.; Sciani, J.M.; da Rocha, C.Q.; Longato, G.B. Antiproliferative Activity of Two Unusual Dimeric Flavonoids, Brachydin E and Brachydin F, Isolated from *Fridericia platyphylla* (Cham.) L.G.Lohmann: In Vitro and Molecular Docking Evaluation. *BioMed Res. Int.* **2022**, *2022*, 3319203. [\[CrossRef\]](#)
21. Nunes, H.L.; Tuttis, K.; Serpeloni, J.M.; Nascimento, J.R.; do da Rocha, C.Q.; Silva, V.A.O.; Lengert, A.v.H.; Reis, R.M.; de Syllos Cólus, I.M. Characterization of the in vitro cytotoxic effects of brachydins isolated from *Fridericia platyphylla* in a prostate cancer cell line. *J. Toxicol. Environ. Health Part A* **2020**, *83*, 547–558. [\[CrossRef\]](#)
22. Ribeiro, T.G.; Chávez-Fumagalli, M.A.; Valadares, D.G.; Franca, J.R.; Lage, P.S.; Duarte, M.C.; Andrade, P.H.R.; Martins, V.T.; Costa, L.E.; Arruda, A.L.A.; et al. Antileishmanial activity and cytotoxicity of Brazilian plants. *Exp. Parasitol.* **2014**, *143*, 60–68. [\[CrossRef\]](#)
23. Carneiro, G.; Aguiar, M.G.; Fernandes, A.P.; Ferreira, L.A.M. Drug delivery systems for the topical treatment of cutaneous leishmaniasis. *Expert Opin. Drug Deliv.* **2012**, *9*, 1083–1097. [\[CrossRef\]](#)
24. Rai, V.K.; Mishra, N.; Yadav, K.S.; Yadav, N.P. Nanoemulsion as pharmaceutical carrier for dermal and transdermal drug delivery: Formulation development, stability issues, basic considerations and applications. *J. Control. Release* **2018**, *270*, 203–225. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
25. Santos, D.C.M.; dos de Souza, M.L.S.; Teixeira, E.M.; Alves, L.L.; Vilela, J.M.C.; Andrade, M.; Carvalho, M.d.G.; Fernandes, A.P.; Ferreira, L.A.M.; Aguiar, M.M.G. A new nanoemulsion formulation improves antileishmanial activity and reduces toxicity of amphotericin B. *J. Drug Target.* **2018**, *26*, 357–364. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
26. Figueiredo, A.; Anholetto, L.A.; Cola, D.F.; Fantatto, R.R.; Gainza, Y.A.; dos Santos, I.B.; Viçozzi, G.P.; Ávila, D.S.; Fraceto, L.F.; Chagas, A.C.d.S. Acaricides containing zein nanoparticles: A tool for a lower impact control of the cattle tick *Rhipicephalus microplus*. *Vet. Parasitol.* **2023**, *318*, 109918. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)

27. Luo, Y.; Wang, Q. Zein-based micro- and nano-particles for drug and nutrient delivery: A review. *J. Appl. Polym. Sci.* **2014**, *131*, 1. [\[CrossRef\]](#)
28. Hu, K.; McClements, D.J. Fabrication of surfactant-stabilized zein nanoparticles: A pH modulated antisolvent precipitation method. *Food Res. Int.* **2014**, *64*, 329–335. [\[CrossRef\]](#)
29. Pereira, A.E.S.; Grillo, R.; Mello, N.F.S.; Rosa, A.H.; Fraceto, L.F. Application of poly(epsilon-caprolactone) nanoparticles containing atrazine herbicide as an alternative technique to control weeds and reduce damage to the environment. *J. Hazard. Mater.* **2014**, *268*, 207–215. [\[CrossRef\]](#)
30. Zhang, Y.; Niu, Y.; Luo, Y.; Ge, M.; Yang, T.; Yu, L.; Wang, Q. Fabrication, characterization and antimicrobial activities of thymol loaded zein nanoparticles stabilized by sodium caseinate–chitosan hydrochloride double layers. *Food Chem.* **2014**, *142*, 269–275. [\[CrossRef\]](#)
31. Bezerra, J.L.; Costa, G.C.; Lopes, T.C.; Carvalho, I.C.D.S.; Patrício, F.J.; Sousa, S.M.; Amaral, F.M.M.; Rebelo, J.M.M.; Guerra, R.N.M.; Ribeiro, M.N.S.; et al. Avaliação da atividade leishmanicida in vitro de plantas medicinais. *Rev. Bras. Farmacogn.* **2006**, *16*, 631–637. [\[CrossRef\]](#)
32. Kumar, P.; Nagarajan, A.; Uchil, P.D. Analysis of Cell Viability by the alamarBlue Assay. *Cold Spring Harb. Protoc.* **2018**. [\[CrossRef\]](#)
33. Salgado, C.; Morin, H.; Coriolano de Aquino, N.; Neff, L.; Quintino da Rocha, C.; Vilegas, W.; Marcourt, L.; Wolfender, J.-L.; Jordan, O.; Ferreira Queiroz, E.; et al. In Vitro Anti-Inflammatory Activity in Arthritic Synoviocytes of *A. brachypoda* Root Extracts and Its Unusual Dimeric Flavonoids. *Molecules* **2020**, *25*, 5219. [\[CrossRef\]](#)
34. Naharros-Molinero, A.; Caballo-González, M.Á.; de la Mata, F.J.; García-Gallego, S. Direct and Reverse Pluronic Micelles: Design and Characterization of Promising Drug Delivery Nanosystems. *Pharmaceutics* **2022**, *14*, 2628. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
35. Crucho, C.I.C.; Barros, M.T. Polymeric nanoparticles: A study on the preparation variables and characterization methods. *Mater. Sci. Eng. C* **2017**, *80*, 771–784. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
36. Da Rosa, C.G.; de Oliveira Brisola Maciel, M.V.; de Carvalho, S.M.; de Melo, A.P.Z.; Jummes, B.; da Silva, T.; Martelli, S.M.; Villetti, M.A.; Bertoldi, F.C.; Barreto, P.L.M. Characterization and evaluation of physicochemical and antimicrobial properties of zein nanoparticles loaded with phenolics monoterpenes. *Colloids Surf. A* **2015**, *481*, 337–344. [\[CrossRef\]](#)
37. Bhattacharjee, S. DLS and zeta potential—What they are and what they are not? *J. Control. Release* **2016**, *235*, 337–351. [\[CrossRef\]](#)
38. Mohanraj, V.J.; Chen, Y. Nanoparticles—A review. *Trop. J. Pharm. Res.* **2007**, *5*, 561–573. [\[CrossRef\]](#)
39. Wulff-Pérez, M.; de Vicente, J.; Martín-Rodríguez, A.; Gálvez-Ruiz, M.J. Controlling lipolysis through steric surfactants: New insights on the controlled degradation of submicron emulsions after oral and intravenous administration. *Int. J. Pharm.* **2012**, *423*, 161–166. [\[CrossRef\]](#)
40. Grillo, R.; Dias, F.V.; Querobino, S.M.; Alberto-Silva, C.; Fraceto, L.F.; de Paula, E.; de Araujo, D.R. Influence of hybrid polymeric nanoparticle/thermosensitive hydrogels systems on formulation tracking and in vitro artificial membrane permeation: A promising system for skin drug-delivery. *Colloids Surf. B Biointerfaces* **2019**, *174*, 56–62. [\[CrossRef\]](#)
41. Schaffazick, S.R.; Guterres, S.S.; Freitas, L.d.L.; Pohlmann, A.R. Caracterização e estabilidade físico-química de sistemas poliméricos nanoparticulados para administração de fármacos. *Quim. Nova* **2003**, *26*, 726–737. [\[CrossRef\]](#)
42. De Oliveira, J.L.; Campos, E.V.R.; Pereira, A.E.S.; Pasquoto, T.; Lima, R.; Grillo, R.; de Andrade, D.J.; dos Santos, F.A.; Fraceto, L.F. Zein Nanoparticles as Eco-Friendly Carrier Systems for Botanical Repellents Aiming Sustainable Agriculture. *J. Agric. Food Chem.* **2018**, *66*, 1330–1340. [\[CrossRef\]](#)
43. Luis, A.I.S.; Campos, E.V.R.; de Oliveira, J.L.; Guilger-Casagrande, M.; de Lima, R.; Castanha, R.F.; de Castro, V.L.S.S.; Fraceto, L.F. Zein Nanoparticles Impregnated with Eugenol and Garlic Essential Oils for Treating Fish Pathogens. *ACS Omega* **2020**, *5*, 15557–15566. [\[CrossRef\]](#)
44. Nascimento, M.H.M.; Franco, M.K.K.D.; Yokaichyia, F.; de Paula, E.; Lombello, C.B.; de Araujo, D.R. Hyaluronic acid in Pluronic F-127/F-108 hydrogels for postoperative pain in arthroplasties: Influence on physico-chemical properties and structural requirements for sustained drug-release. *Int. J. Biol. Macromol.* **2018**, *111*, 1245–1254. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
45. Rarokar, N.; Agrawal, R.; Yadav, S.; Khedekar, P.; Ravikumar, C.; Telange, D.; Gurav, S. Pteroyl-γ-l-glutamate/Pluronic® F68 modified polymeric micelles loaded with docetaxel for targeted delivery and reduced toxicity. *J. Mol. Liq.* **2023**, *369*, 120842. [\[CrossRef\]](#)
46. Ali, S.; Khatri, Z.; Oh, K.W.; Kim, I.-S.; Kim, S.H. Zein/cellulose acetate hybrid nanofibers: Electrospinning and characterization. *Macromol. Res.* **2014**, *22*, 971–977. [\[CrossRef\]](#)
47. Corradini, E.; Curti, P.; Meniqueti, A.; Martins, A.; Rubira, A.; Muniz, E. Recent Advances in Food-Packing, Pharmaceutical and Biomedical Applications of Zein and Zein-Based Materials. *Int. J. Mol. Sci.* **2014**, *15*, 22438–22470. [\[CrossRef\]](#)
48. Da Costa, R.S.; Negrão, C.A.B.; Camelo, S.R.P.; Ribeiro-Costa, R.M.; Barbosa, W.L.R.; da Costa, C.E.F.; Silva Júnior, J.O.C. Investigation of thermal behavior of *Heliotropium indicum* L. lyophilized extract by TG and DSC. *J. Therm. Anal. Calorim* **2013**, *111*, 1959–1964. [\[CrossRef\]](#)
49. Salay, L.C.; Prazeres, E.A.; Marín Huachaca, N.S.; Lemos, M.; Piccoli, J.P.; Sanches, P.R.S.; Cilli, E.M.; Santos, R.S.; Feitosa, E. Molecular interactions between Pluronic F127 and the peptide tritrypticin in aqueous solution. *Colloid Polym. Sci.* **2018**, *296*, 809–817. [\[CrossRef\]](#)
50. Dai, R.Y.; You, S.Y.; Lu, L.M.; Liu, Q.; Li, Z.X.; Wei, L.; Huang, X.G.; Yang, Z.Y. High blades spreadability of chlorpyrifos microcapsules prepared with polysiloxane sodium carboxylate/sodium carboxymethylcellulose/gelatin via complex coacervation. *Coll. Surf. A Physicochem. Eng. Asp.* **2017**, *530*, 13–19. [\[CrossRef\]](#)

51. Chen, S.; Xu, C.; Mao, L.; Liu, F.; Sun, C.; Dai, L.; Gao, Y. Fabrication and characterization of binary composite nanoparticles between zein and shellac by anti-solvent co-precipitation. *Food Bioprod. Process.* **2018**, *107*, 88–96. [[CrossRef](#)]
52. Raval, N.; Maheshwari, R.; Kalyane, D.; Youngren-Ortiz, S.R.; Chougule, M.B.; Tekade, R.K. Importance of Physicochemical Characterization of Nanoparticles in Pharmaceutical Product Development. In *Basic Fundamentals of Drug Delivery*; Elsevier: Amsterdam, The Netherlands, 2019; pp. 369–400. [[CrossRef](#)]
53. Lopes, A.C.C.B.; do Nascimento, J.R.; Camara, M.B.P.; Lima, A.D.S.; Lopes, G.L.N.; do Nascimento, M.O.; Xavier, J.K.A.M.; de Jesus, C.M.; Mendonça, C.J.S.; Carvalho, A.L.M.; et al. Chemical Characterization, Leishmanicidal Activity and In Vitro Cytotoxicity of the Essential Oil Extracted from *Pectis brevipedunculata* (Gardner) Sch.Bip. and Its Incorporation into Microemulsion Systems. *Pharmaceutics* **2024**, *16*, 87. [[CrossRef](#)]
54. Saleem, K.; Khursheed, Z.; Hano, C.; Anjum, I.; Anjum, S. Applications of Nanomaterials in Leishmaniasis: A Focus on Recent Advances and Challenges. *Nanomaterials* **2019**, *9*, 1749. [[CrossRef](#)]
55. Tiuman, T.S.; Santos, A.O.; Ueda-Nakamura, T.; Filho, B.P.D.; Nakamura, C.V. Recent advances in leishmaniasis treatment. *Int. J. Infect. Dis.* **2011**, *15*, e525–e532. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
56. Do Nascimento, T.G.; da Silva, P.F.; Azevedo, L.F.; da Rocha, L.G.; de Moraes Porto, I.C.C.; Lima e Moura, T.F.A.; Basílio-Júnior, I.D.; Grillo, L.A.M.; Dornelas, C.B.; Fonseca, E.J.d.S.; et al. Polymeric Nanoparticles of Brazilian Red Propolis Extract: Preparation, Characterization, Antioxidant and Leishmanicidal Activity. *Nanoscale Res. Lett.* **2016**, *11*, 301. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
57. Jiang, L.Q.; Wang, T.Y.; Webster, T.J.; Duan, H.-J.; Qiu, J.Y.; Zhao, Z.M.; Yin, X.-X.; Zheng, C.L. Intracellular disposition of chitosan nanoparticles in macrophages: Intracellular uptake, exocytosis, and intercellular transport. *Int. J. Nanomed.* **2017**, *12*, 6383–6398. [[CrossRef](#)]

Disclaimer/Publisher's Note: The statements, opinions and data contained in all publications are solely those of the individual author(s) and contributor(s) and not of MDPI and/or the editor(s). MDPI and/or the editor(s) disclaim responsibility for any injury to people or property resulting from any ideas, methods, instructions or products referred to in the content.